

Universitätsklinikum Jena  
Institut für Medizinische Mikrobiologie

# **Modulation der Synthese extrazellulärer Matrix- proteine durch *Chlamydia pneumoniae***

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biol. Jürgen Baumert

geboren am 17.09.1971 in Jena

Jena, im Juli 2008

Gutachter:

1. Prof. Dr. Eberhard Straube (Jena)
2. Prof. Dr. Hans Peter Saluz (Jena)
3. Prof. Dr. Matthias Maaß (Salzburg)

Tag der öffentlichen Disputation: 30. März 2009

# Inhalt

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Thematischer Hintergrund .....	1
1.2. Remodeling als Pathomechanismus .....	1
1.3. Chlamydien – Pathogene durch Immunevasion .....	4
1.4. <i>Chlamydia pneumoniae</i> und Remodeling .....	9
1.5. Zielstellung.....	10
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
Zellkulturen und Kultivierungsbedingungen .....	12
Kulturmedien .....	13
Chlamydien und Infektion der Zellen .....	14
Bestimmung der Infektionsrate .....	15
Inkubation von Zellen mit konditioniertem Medium.....	15
MMP-1 Neutralisation .....	16
Zytokin-Neutralisation .....	16
COX-2-Inhibition.....	17
RNA-Interferenz .....	17
Stimulation von Zellen mit Zytokinen .....	17
Stimulation von Zellen mit chlamydialem Hsp60 .....	18
RNA-Isolierung und RT-PCR.....	19
Western-Blot .....	21
ELISA .....	23
Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	24
Statistische Auswertungen .....	25
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
3.1. Infektionsraten der untersuchten Zelltypen.....	26
3.2. Einfluss der Infektion auf die Matrixproteinsynthese.....	27
Epithelzellen.....	27
Glatte Muskelzellen .....	28
Fibroblasten.....	30
Immunfluoreszenzfärbung extrazellulärer Matrixproteine bei Fibroblasten .....	32
Chlamydieninaktivierung durch Hitze oder UV-Licht .....	33
Neutralisation von MMP-1 im Kulturüberstand infizierter Fibroblasten .....	34

<b>3.3. Beeinflussung der Matrixproteinsynthese durch lösliche Mediatoren .....</b>	<b>34</b>
Einfluss der Überstände infizierter Fibroblasten auf nicht infizierte Fibroblasten ....	34
Inhibition der PGE <sub>2</sub> -Synthese bei infizierten Fibroblasten.....	36
Der Einfluss von chlamydialem Hsp60 auf die Matrixproteinsynthese .....	37
Neutralisation löslicher Mediatoren im Kulturüberstand von Fibroblasten.....	38
Einfluss der Überstände infizierter Epithelzellen auf Fibroblasten .....	41
Neutralisation löslicher Mediatoren im Kulturüberstand von Epithelzellen.....	42
Einfluss der Überstände infizierter Leukozyten auf Fibroblasten.....	44
Bildung und Aktivierung von TGF-β1 durch chlamydieninfizierte Fibroblasten .....	46
<b>3.4. Zusammenwirken von Infektion und Mediatoren der Immunantwort.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5. C/EBP-β als Faktor der Matrixproteinregulation durch <i>C. pneumoniae</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>50</b>
Der Einfluss von löslichen Mediatoren auf die Matrixproteinsynthese.....	51
Molekulare Mechanismen der Kollagenregulation durch <i>C. pneumoniae</i> .....	53
Die Rolle von TGF-β bei <i>C. pneumoniae</i> Infektionen.....	55
Diskussion der Ergebnisse im Kontext von Asthma, COPD und Atherosklerose.....	58
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>65</b>
<b>6. Summery .....</b>	<b>67</b>
<b>7. Literatur .....</b>	<b>68</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>85</b>
<b>9. Anlagen.....</b>	<b>86</b>
Lebenslauf.....	86
Wissenschaftliche Beiträge und Veröffentlichungen.....	87
Selbständigkeitserklärung .....	88



## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin
C/EPB- $\beta$	CCAAT enhancer binding protein $\beta$
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cHsp60	chlamydiales Hitzeschockprotein 60
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
COX-2	Zyklooxygenase 2
EB	Elementarkörper
ELISA	enzyme linked immune sorbent assay
FEV <sub>1</sub>	forciertes Expirationsvolumen pro Sekunde
HRP	Meerrettichperoxidase
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IgA, IgG	Immunglobulin A oder G
IL	Interleukin
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOMP	major outer membrane protein
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PB	Phosphatpuffer
PDGF	platelet derived growth factor
PDH	Pyruvatdehydroxygenase
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
RB	Retikularkörper
siRNA	short inhibitory ribonuclein acid
SMC	smooth muscle cells
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR	toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T-Zellen	Thymuszellen

# 1. Einleitung

## 1.1. Thematischer Hintergrund

Die Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen ist mit Schädigungen und fibrotischen Umbauprozessen (Remodeling) der betroffenen Gewebe und Organe und daraus resultierenden Funktionseinschränkungen verbunden. Hierbei werden verstärkt extrazelluläre Matrixproteine, vor allem Kollagene, durch Fibroblasten oder glatte Muskelzellen synthetisiert. Als Ursache haben neben toxischen und oxidativen Schädigungen sowie dauerhaften mechanischen Reizungen auch persistente mikrobielle Infektionen eine nicht zu unterschätzende Bedeutung. Insbesondere die chronischen multifaktoriell bedingten Krankheiten Asthma bronchiale und Atherosklerose wurden mit dem obligat intrazellulären Bakterium *Chlamydia (C.) pneumoniae* assoziiert. Dieser Erreger ließ sich im Vergleich zu gesunden Personen häufiger in den Atemwegen von Asthmatikern nachweisen und wurde darüber hinaus in atherosklerotischen Plaques detektiert. Auch durch seroepidemiologische und tierexperimentelle Studien konnten vielfältige Hinweise auf eine Beteiligung dieses Organismus am Krankheitsgeschehen und mögliche pathogenetische Mechanismen gefunden werden. Über die kausalen Zusammenhänge zwischen Chlamydieninfektionen und Remodeling-Prozessen ist aber nur sehr wenig bekannt. Deshalb sollte in dieser Arbeit der Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Synthese extrazellulärer Matrixproteine von glatten Muskelzellen und Fibroblasten untersucht werden.

## 1.2. Remodeling als Pathomechanismus

Verletzungen des Epithels oder Endothels induzieren eine Entzündungsreaktion, die den Organismus in erster Linie vor eindringenden Krankheitserregern und deren schädlichen Einflüssen schützen soll und darüber hinaus auch Wundheilungsprozesse in Gang setzt, die das zerstörte Gewebe durch Dedifferenzierung, Proliferation und Migration von Epithel- oder Endothelzellen normalerweise schnell ersetzen. Dieses Remodeling ist bei akuten Schädigungen eine normale Reaktion, um die Struktur und Integrität des Gewebes wiederherzustellen. Wiederholte oder chronische Entzündungen können solche Reparaturmechanismen jedoch permanent aktivieren und führen vor allem durch die übermäßige Bildung von Bindegewebe zu einem pathologischen Remodeling, welches langfristig die normale Struktur der betroffenen Organe zerstört und so deren Funktion beeinträchtigt (Jeffery, 2001; Wynn, 2007).

Bindegewebe besteht nicht aus geschlossenen Zellverbänden, sondern weist zwischen den Zellen größere Zwischenräume auf, die von der extrazellulären Matrix ausgefüllt werden. Diese wird von Fibroblasten oder Myofibroblasten synthetisiert und setzt sich aus einer amorphen Grundsubstanz (Proteoglykane, Glykoproteine, Wasser) und geformten Strukturen, wie Fibrillen oder Fasern, zusammen (Scott, 1995). Kollagene sind die wichtigsten Strukturproteine der extrazellulären Matrix und Hauptbestandteil vieler Bindegewebe. Sie stellen beim Menschen eine aus über 25 Typen bestehende große Gruppe von Proteinen dar. Kollagenmoleküle sind aus 3 helikalen Polypeptidketten ( $\alpha$ -Ketten) aufgebaut, die sich in Form einer Superhelix umeinander winden. Jeder Kollagentyp setzt sich aus einer bestimmten Kombination verschiedener oder gleicher genetisch determinierter  $\alpha$ -Ketten zusammen. Die einzelnen Ketten besitzen eine sich sehr oft wiederholende Peptidsequenz, bei der jede dritte Aminosäure Glyzin ist. Ein häufiges Sequenzmotiv ist Glyzin-Prolin-Hydroxyprolin. Diese Struktur ermöglicht die Ausbildung der Tripelhelix und dient zur Stabilisierung der Formation. Die Polypeptidketten werden als größere Vorläufermoleküle (pro  $\alpha$ -Ketten) mit N- und C-terminalen Propeptiden synthetisiert und posttranslational im endoplasmatischen Retikulum durch Hydroxylierung einzelner Prolin- und Lysinreste sowie Glykosylierungen modifiziert. Nach der Formation der Tripelhelix werden diese Prokollagenmoleküle über Exozytose in den Extrazellularraum freigesetzt. Hier erfolgt mit Hilfe von spezifischen Proteasen die Abspaltung der Propeptide, und die reifen Kollagenmoleküle lagern sich zu Fibrillen oder retikulären Strukturen zusammen. Fibrillen aggregieren daraufhin in einem weiteren Schritt zu Kollagenfasern (Canty & Kadler, 2005; Kucharz, 1992; van der Rest & Garrone, 1991).

Die fibrillären Kollagene I und III sind die häufigsten Strukturproteine der extrazellulären Matrix aller Organe, die oft mit dem ebenfalls fibrillären Kollagen V vergesellschaftet sind (Birk, 2001; Kucharz, 1992). Dieses stellt wahrscheinlich auch den Übergang zur Basalmembran her (Konomi *et al.*, 1984). Die Basalmembran ist eine spezialisierte extrazelluläre Matrix, die Epithelien- bzw. Endothelien an ihrer basalen Seite stabilisiert und verschiedene Zelltypen umgibt. Der zentrale Anteil (Lamina densa) besteht aus Kollagen IV, welches ein geflechtartiges Netzwerk bildet und nur hier zu finden ist (Hudson *et al.*, 1993; Yurchenco & Schittny, 1990). Hauptsächlich über das dimere Glykoprotein Fibronectin wird die Bindung von Zellen untereinander und an Elemente der extrazellulären Matrix vermittelt. Es ist auf der Oberfläche der meisten Zellen zu finden und ein wichtiger Bestandteil der oberen und unteren Schicht (Lamina rara interna/externa) der Basalmembran (Magnusson & Mosher, 1998).

Entzündungsbedingte strukturelle Veränderungen der Atemwege sind ein wesentliches Merkmal der obstruktiven Lungenerkrankungen Asthma bronchiale und chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Postma & Timens, 2006). Beim Asthma treten in den Bronchien bereits im Kindesalter subepitheliale Verdickungen der Übergangsschicht der Basalmembran zum Bindegewebe (Lamina reticularis) auf (Payne *et al.*, 2003). Hierbei werden vermehrt die Kollagene I, III und V sowie Fibronektin durch glatte Muskelzellen und Fibroblasten gebildet, während die Menge und Verteilung des von Epithelzellen synthetisierten Kollagens IV unverändert bleibt (Brewster *et al.*, 1990; Roche *et al.*, 1989). Dagegen sind mehr diffuse fibrotische Veränderungen tieferer Schichten der Bronchialwand charakteristisch für das Remodeling der Bronchiolen bei COPD (Jeffery, 2004). Sowohl bei Asthma als auch COPD kann in den Atemwegen eine vermehrte Anzahl von subepithelialen Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Hyperplasie) gefunden werden (Chung, 2005; Johnson & Burgess, 2004). Die verstärkte Bildung von Bindegewebe führt zur Obstruktion der Bronchien und Bronchiolen und beeinträchtigt damit die Lungenfunktion.

Auch bei der Atherosklerose finden infolge der chronischen Entzündung Remodelingprozesse als Reparaturantwort auf die Verletzungen der Gefäßwand statt und sind ein Teil des Pathomechanismus dieser Krankheit (Katsuda & Kaji, 2003; Ross, 1999). Die interstitiellen Kollagene I und III sind die wichtigsten Bestandteile der fibrösen Kappe atherosklerotischer Plaques, die den lipidreichen Kern mit seinem hochgradig thrombogenen Material vom Blutstrom trennt (McCullagh *et al.*, 1980; Murata *et al.*, 1986). Diese werden von glatten Muskelzellen synthetisiert, die im Verlauf der Atherogenese von der Media in den Bereich der Intima wandern und dort proliferieren. Kollagen IV ist in großen Mengen unterhalb von Endothelzellen zu finden und umgibt glatte Muskelzellen in mehreren konzentrischen Schichten (Katsuda *et al.*, 1992; Shekhonin *et al.*, 1985). Auch der Anteil von Kollagen V steigt mit der fortschreitenden Entwicklung der Plaques, und Fibronektin wird vor allem in frühen und restenotischen Läsionen gebildet (Katsuda *et al.*, 1992; Labat-Robert *et al.*, 1985). Eine verstärkte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen trägt zum Plaquedickenwachstum bei, während ein übermäßiger Abbau oder eine verringerte Synthese die Entstehung von instabilen Plaques fördert.

### 1.3. Chlamydien – Pathogene durch Immunevasion

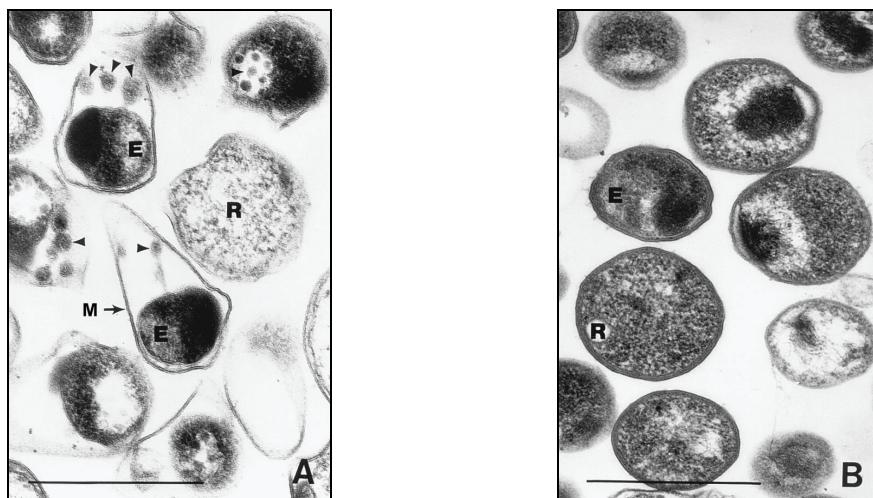
Chlamydien gehören zu den weltweit am weitesten verbreiteten Pathogenen. Die von diesen Mikroorganismen beim Menschen verursachten Krankheiten und daraus resultierende Komplikationen äußern sich in sehr vielfältigen klinischen Symptomen (*Tab. 1*) und stellen eine Herausforderung für die Gesundheitssysteme als auch für die Forschung dar. *C. trachomatis* ist einer der häufigsten Erreger von sexuell übertragenen Krankheiten sowie die Hauptursache von Erblindung in Entwicklungsländern (Gerbase *et al.*, 1998; Thylefors *et al.*, 1995). *C. pneumoniae* verursacht verschiedene Infektionen des Respirationstraktes, die aber meist asymptomatisch oder mild verlaufen (Blasi *et al.*, 2000; Burkhardt *et al.*, 2003) und ist in Deutschland nur selten der Auslöser einer atypischen Pneumonie (Wellinghausen *et al.*, 2006). In erster Linie tierpathogene Arten sind in der Lage, beim Menschen schwere Zoonosen zu verursachen. *C. psittaci* kann nach engem Kontakt mit infizierten Vögeln auf den Menschen übertragen werden und ruft akute atypische Pneumonien (Psittakose) mit lebensbedrohlichen Komplikationen hervor (Elliott, 2001). Der bei Wiederkäuern auftretende Erreger *C. abortus* führt gelegentlich bei Schwangeren, die im landwirtschaftlichen Bereich tätig sind, zu generalisierten Infektionen und zum Abort (Pospischil *et al.*, 2002; Sachse & Grossmann, 2002). Eine humanpathologische Bedeutung von weiteren Chlamydienarten ist nicht auszuschließen, was aber bisher noch weitgehend ungeklärt ist.

**Tab 1:** Erkrankungen durch Chlamydien beim Menschen

Spezies	Wirt	Erkrankung	Verbreitung
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Mensch Säugetiere Reptilien Amphibien	Sinusitis, Bronchitis, Pharyngitis, atypische Pneumonie; Beteiligung an Atherosklerose und Asthma bronchiale noch umstritten	weltweit
<i>Chlamydia trachomatis</i> Serotypen A – C	Mensch	Konjunktivitis, Trachom	Südostasien, Südamerika, Indien, Afrika, Mittlerer Osten; in Mitteleuropa und USA selten
Serotypen D – K	Mensch	Urethritis, Zervizitis, Salpingitis, Einschlusskonjunktivitis, reaktive Arthritis	weltweit
Serotypen L <sub>1</sub> – L <sub>3</sub>	Mensch	Lymphogranuloma venereum	Südamerika, Mittelamerika, Asien, Afrika; in Mitteleuropa und USA selten
<i>Chlamydia psittaci</i>	Vögel Mensch	Psittakose, Ornithose	weltweit
<i>Chlamydia abortus</i>	Wiederkäuer Mensch	nekrotisierende Plazentitis, Abort	weltweit

Die Ordnung *Chlamydiales* umfasst eine Reihe von Bakterien, die durch ihr obligates Wachstum in eukaryotischen Zellen charakterisiert sind. Sie unterscheiden sich von anderen intrazellulären Bakterien durch ihren einmaligen biphasischen Entwicklungszyklus, der das verbindende Hauptmerkmal dieser Gruppe ist. In den letzten Jahren hat sich die Ordnung um mehrere neue Spezies erweitert, die eine Vielzahl von Wirten aus unterschiedlichen taxonomischen Gruppen, wie z. B. Amöben, Fliegen, Krebse, Amphibien, Fische oder Säugetiere besiedeln können. Ausgehend von vergleichenden Untersuchungen der ribosomalen 16S- und 23S RNA wurde deshalb vorgeschlagen, die Familie *Chlamydiaceae* mit der bisher einzigen Gattung *Chlamydia* weiter aufzuspalten (Everett *et al.*, 1999). Diese Taxonomie, welche den neuen Gattungsnamen *Chlamydophila* für die Art *Chlamydia pneumoniae* vorsieht, ist umstritten und wird derzeit mehrheitlich noch nicht akzeptiert (Schachter *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wird deshalb der alte Gattungsname *Chlamydia* verwendet.

Chlamydien sind unbeweglich, kokkoid und besitzen eines der kleinsten prokaryotischen Genome. Sie bilden in ihrem Entwicklungszyklus zwei funktionell und morphologisch unterschiedliche Lebensformen aus (Abb. 1). Die etwa 0,3 µm großen metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (EB) sind die extrazelluläre sporenähnliche Infektionsform, die auch ungünstigen Umweltbedingungen widerstehen kann. Die größeren (0,5-1 µm), nur intrazellulär vorkommenden, nicht infektiösen Retikularkörperchen (RB) sind die Replikationsform dieser Mikroorganismen (Pearce & Gaston, 2001).

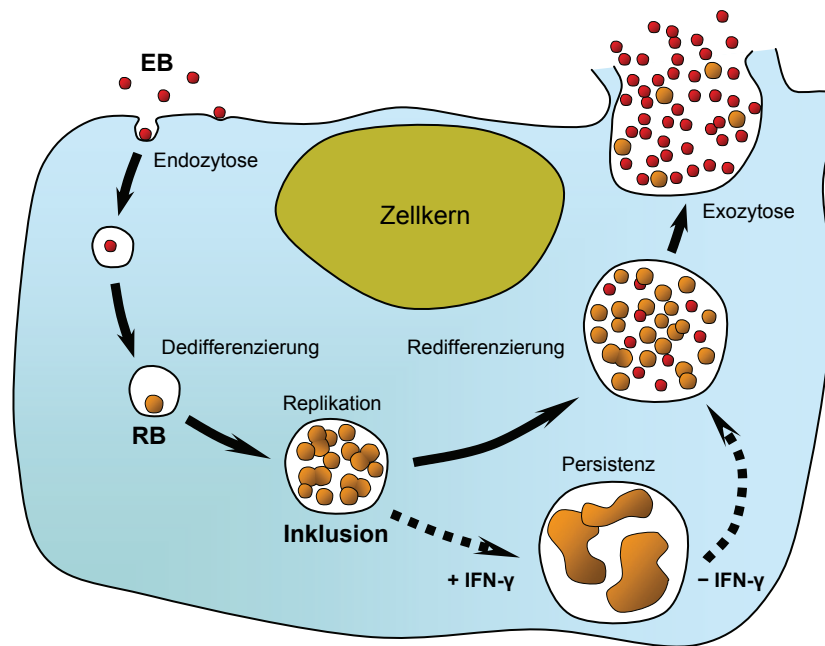


**Abb. 1:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) *C. pneumoniae* und (B) *C. trachomatis*. Die Pfeilspitzen zeigen auf elektronendichte Körper (Minikörper), deren Funktion unbekannt ist. E - Elementarkörper, R - Retikularkörper, M - Außenmembran. Schwarzer Balken = 0,5 µm. Aus Kuo *et al.* (1995); verändert.

Die Zellwand besteht aus einer inneren sowie einer äußeren Membran und besitzt Lipopolysaccharid (LPS), enthält aber im Unterschied zu gramnegativen Bakterien kein oder nur sehr wenig Peptidoglykan (Barbour *et al.*, 1982; Fox *et al.*, 1990). Die Stabilisierung der Membranstruktur erfolgt bei EB durch das major outer membrane protein (MOMP) sowie mehrere periplasmatische cysteinreiche Proteine (CRP), die alle miteinander über Disulfidbrücken vernetzt sind (Hatch, 1996; Melgosa *et al.*, 1993). Da RB diese Vernetzungen nicht besitzen, sind sie wesentlich fragiler und im Gegensatz zu EB osmotisch instabil.

Epithelzellen der Schleimhäute sind primäre Wirtszellen für Chlamydien. Die Adhärenz der infektiösen EB wird wahrscheinlich über Glykosaminoglykane (GAG) vermittelt (Wuppermann *et al.*, 2001; Zhang & Stephens, 1992). Auch MOMP oder andere Membranproteine scheinen hierbei beteiligt zu sein (Moelleken & Hegemann, 2008; Stephens *et al.*, 2001; Su *et al.*, 1996). Die Internalisation erfolgt nach Aktivierung von verschiedenen Wirtszellsignalwegen durch Rearrangement des Aktin-Zytoskeletts (Dautry-Varsat *et al.*, 2005). Die Fusion des Endosoms mit dem Lysosom wird verhindert, indem Sphingolipide des Golgi-Apparates in die Membran des Endosoms integriert werden und dieses so als Exozytosevesikel tarnen (Hackstadt *et al.*, 1996; Scidmore *et al.*, 2003; Wolf & Hackstadt, 2001). Im Endosom wandeln sich die EB zu RB um, die sich durch asynchrone Teilung vermehren. Dies führt zur Bildung von so genannten Einschlusskörperchen (Inklusionen). Nach 48-72 h redifferenzieren die RB wieder zu EB und werden durch Exozytose oder Lyse der Zelle freigesetzt (*Abb. 2*). Die bisherige Annahme, dass Chlamydien Adenosintriphosphat (ATP) für ihren Stoffwechsel ausschließlich von der Wirtszelle beziehen (Moulder, 1991), wird in letzter Zeit angezweifelt, da sich während der Replikationsphase eine Reihe von funktionell aktiven Enzymen für die ATP-Synthese und die Bereitstellung von Reduktionspotential nachweisen lassen (Iliffe-Lee & McClarty, 1999; McClarty, 1994).

Die Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen erfolgt im Wesentlichen über die zellvermittelte Immunantwort. Interferone und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), die vor allem von aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten freigesetzt werden, sind bei Chlamydieninfektionen die wichtigsten Effektormoleküle. Diese wirken über verschiedene Mechanismen, wobei die Induktion des Enzyms Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), welches die für Chlamydien essentielle Aminosäure Tryptophan abbaut, beim Menschen die größte Bedeutung zu haben scheint (Pantoja *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1993). IDO kann bei Fibroblasten auch direkt durch die Infektion auf auto- oder parakrinem Wege induziert werden (Gupta *et al.*, 1994; Rödel *et al.*, 1999).



**Abb. 2:** Entwicklungszyklus von Chlamydien in der Wirtszelle. EB - Elementarkörper, RB - Retikularkörper.

Chlamydien haben verschiedene Strategien entwickelt, um der Zerstörung durch die Immunabwehr zu entgehen. So können sie die Apoptose ihrer Wirtszelle verhindern und sind auf diese Weise vor den Angriffen von zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen geschützt (Airenne *et al.*, 2002; Greene *et al.*, 2004). Auf infizierten Zellen ist zudem die Expression von MHC-Molekülen inhibiert, so dass die Erkennung durch Antigen-spezifische T-Zellen erschwert wird (Rödel *et al.*, 1998a; Zhong *et al.*, 1999). Die dadurch möglicherweise verzögerte und unzureichende Freisetzung des Haupteffektormoleküls IFN- $\gamma$  kann dann die Etablierung der Infektion nicht effektiv verhindern. In vitro bewirken physiologische Konzentrationen dieses Zytokins zwar eine Unterbrechung des normalen Entwicklungszyklus, aber es kommt zur Ausbildung von vergrößerten pleomorphen Retikularkörpern (Abb. 2), die sich nicht mehr teilen und vorwiegend ATP der Wirtszelle nutzen (Beatty *et al.*, 1993; Beatty *et al.*, 1994; Gerard *et al.*, 2002). Nach Entfernung von IFN- $\gamma$  oder Zugabe von Tryptophan bilden sich solche Formen wieder zurück und die normale Entwicklung wird fortgesetzt (Beatty *et al.*, 1995). Dieses Phänomen kann als Anpassungsreaktion angesehen werden und ist wahrscheinlich auch in vivo für das Überleben der Chlamydien im entzündeten Gewebe unter dem Druck der Wirtsabwehr von entscheidender Bedeutung (Hogan *et al.*, 2004). Atypische Retikularkörper sind in der Lage, für längere Zeit in der Wirtszelle zu persistieren, was letztlich auf den Mechanismen der Immunevasion beruht. Im Unterschied zur latenten Persistenz verschiedener viraler Er-



reger scheint die Persistenz von Chlamydien mit Phasen der Vermehrung und Freisetzung von infektiösen Elementarkörpern sowie mit der ständigen Aktivierung der Wirtszelle verbunden zu sein (Peters *et al.*, 2005). In dem von Stephens (2003) vorgestellten Konzept zur Pathogenese von Chlamydieninfektionen spielt die Aktivierung der Wirtszelle und die Induktion einer Zytokinantwort die entscheidende Rolle. Die adaptive Immunität führt zusätzlich zu einer Verstärkung dieser Reaktion. Chronische Krankheitsverläufe sind auf die Persistenz des Erregers zurückzuführen, welche das Resultat einer unzureichenden Bekämpfung der Infektion ist. Persistenz könnte daher die Ursache von pathologischen Auswirkungen der Infektion und weiteren Folgeerkrankungen sein.

Aufgrund der Tendenz zu persistenten Infektionen wurde *C. pneumoniae* mit chronischen respiratorischen Erkrankungen wie der chronischen Bronchitis als Manifestation der COPD oder dem nicht-allergischen (intrinsischen) Asthma bronchiale in Verbindung gebracht (Clements *et al.*, 2002; Johnston & Martin, 2005; von Hertzen, 2002). In verschiedenen epidemiologischen Studien ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen diesen Krankheiten und erhöhten Antikörper-Titern oder dem Erreger-Nachweis durch PCR (Hahn, 1999). Infizierte Bronchialepithelzellen produzieren proinflammatorische Zytokine und exprimieren Adhäsionsmoleküle, was den Einstrom und die transepitheliale Migration von Entzündungszellen fördert (Jahn *et al.*, 2000; Krüll *et al.*, 2006). Die Apoptose dieser Zellen kann zudem durch die Aufnahme von Chlamydien verzögert werden (van Zandbergen *et al.*, 2004). Die Infektion könnte so zur Verstärkung oder Chronifizierung der inflammatorischen Reaktion und damit zur Lungendysfunktion beitragen.

Da Chlamydien in Monozyten und dendritischen Zellen überleben können, ist ein Transport aus der Lunge in verschiedene Regionen des Körpers und eine Übertragung auf weitere Zellen möglich (Airenne *et al.*, 1999; Gieffers *et al.*, 2004; Kis *et al.*, 2008; Moazed *et al.*, 1998). Damit ließe sich auch die Assoziation von *C. pneumoniae* mit anderen chronischen Erkrankungen wie Alzheimer-Krankheit, Multipler Sklerose oder Atherosklerose erklären (Campbell & Kuo, 2004; Robinson *et al.*, 2004; Stratton & Wheldon, 2006).

Die weltweit bereits bei jungen Erwachsenen hohe Prävalenz von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* steigt bei höheren Altersklassen auf über 60 % an (Persson, 1990; Saikku, 1999), so dass sich wahrscheinlich fast jeder Mensch im Leben mindestens einmal mit diesem Krankheitserreger infiziert und Reinfektionen nicht selten sind (Aldous *et al.*, 1992; Leinonen, 1993). Diese Tatsache und eine Studie von Saikku (1988), in der bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und akutem Myokardinfekt erhöhte Antikörpertiter gegen

*C. pneumoniae* festgestellt wurden, konsolidierten vor allem die Vermutung einer möglichen pathogenetischen Bedeutung dieses Bakteriums für die Atherosklerose. Eine Vielzahl seroepidemiologischer Studien zeigte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen dem Antikörpernachweis und klinischen Manifestationen dieser Krankheit. Der Erreger konnte durch PCR, Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie und Kultur auch in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Kuo & Campbell, 2000; Saikku, 1999; Taylor-Robinson & Thomas, 2000). In verschiedenen Tiermodellen beschleunigte *C. pneumoniae* im Zusammenwirken mit einer Hypercholesterinämie die Initiation und Progression von atherosklerotischen Plaques. (Campbell *et al.*, 2000a; Campbell *et al.*, 2000b; Muhlestein, 2000). Experimentelle Untersuchungen zeigten außerdem, dass dieser Erreger über verschiedene Mechanismen, wie z. B. die Aktivierung von Endothelzellen, die Induktion der Adhäsion und Transmigration von Leukozyten, die Initiation und Beschleunigung der Schaumzellbildung oder die Verstärkung der Freisetzung von prothrombotischen Faktoren zur Atherogenese beitragen könnte und daher möglicherweise als Kofaktor der Atherosklerose fungiert (Kalayoglu *et al.*, 2002).

#### **1.4. *Chlamydia pneumoniae* und Remodeling**

Untersuchungen zu möglichen biologischen Mechanismen, die strukturelle Veränderungen von Geweben und Organen bei Chlamydieninfektionen bewirken könnten, sind bisher nur vereinzelt durchgeführt worden. In vitro Experimente zeigten, dass lösliche Faktoren von infizierten arteriellen Endothelzellen sowie das chlamydiale Hitzeschockprotein 60 (cHsp60) die Proliferation von glatten Muskelzellen zu stimulieren scheinen (Coombes & Mahony, 1999; Hirono *et al.*, 2003; Sasu *et al.*, 2001). Durch die Infektion werden bei Endothelzellen die Wachstumsfaktoren basic fibroblast growth factor (bFGF) und platelet derived growth factor-B (PDGF-B) induziert (Coombes & Mahony, 2001; Prochnau *et al.*, 2004), die bei der Proliferation von glatten Muskelzellen und der intimalen Verdickung im Rahmen der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielen (Bosse *et al.*, 2006; Newby & Zaltsman, 2000).

Auch bei infizierten glatten Muskelzellen konnte die Induktion von bFGF sowie des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) nachgewiesen werden (Rödel *et al.*, 2000). Erhöhte IL-6-Konzentrationen wurden in den Bronchien von Patienten mit intrinsischem Asthma gefunden (Yokoyama *et al.*, 1995). In Untersuchungen von Rupp *et al.* (2005) induzierte die Infektion bei vaskulären Muskelzellen einen proliferativen Phänotyp, was maßgeblich

durch den Transkriptionsfaktor early growth response gene 1 (Egr-1) vermittelt wurde, der außerdem an der Regulation wichtiger proatherogener Gene beteiligt ist (McCaffrey *et al.*, 2000).

Infizierte Epithelzellen produzieren neben IL-6 und Egr-1 auch IL-11 sowie den connective tissue growth factor (CTGF) (Peters *et al.*, 2005). Bei Asthmatikern sind diese profibrotisch wirkenden Zytokine ebenfalls in erhöhten Konzentrationen nachweisbar (Burgess *et al.*, 2003; Chakir *et al.*, 2003; Minshall *et al.*, 2000). Makrophagen sezernieren nach der Infektion mit *C. pneumoniae* vermehrt die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), die mit Remodeling-Prozessen in der Lunge und atherosklerotischen Veränderungen der Gefäße in Verbindung gebracht wird (Ohbayashi & Shimokata, 2005; Pasterkamp *et al.*, 2000; Vehmaan-Kreula *et al.*, 2001). MMP-9 kann darüber hinaus den transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) aktivieren, der eines der wichtigsten profibrotischen Zytokine ist (Yu & Stamenkovic, 2000). Über diese Wege wäre ein Beitrag von *C. pneumoniae* zum Remodeling bei chronisch entzündlichen Krankheiten, wie Asthma, COPD oder Atherosklerose denkbar.

### 1.5. Zielstellung

Der Nachweis von Zytokinen oder MMPs gab bisher nur indirekte Hinweise auf eine Beteiligung von *C. pneumoniae* an Remodeling-Prozessen. Die Auswirkungen auf die extrazelluläre Matrix wurden dagegen noch nicht betrachtet. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Expression der Kollagentypen I, III, IV, V sowie von Fibronectin in Zellkulturen von glatten Muskelzellen und Fibroblasten auf Transkriptions- und Translationsebene untersucht.

Die interzelluläre Kommunikation über lösliche Mediatoren trägt wesentlich zur Dynamik von Remodeling-Prozessen und zur Ausprägung des Krankheitsbildes bei (Vignola *et al.*, 2002). Da auch Epithelzellen und Monozyten/Makrophagen als primäre Zielzellen von *C. pneumoniae* in die Pathogenese von Chlamydieninfektionen involviert sind, wurden nicht infizierte mesenchymale Zellen mit konditioniertem Medium infizierter Fibroblasten, Epithelzellen und Monozyten inkubiert und der Einfluss auf die Matrixproteinsynthese untersucht. Darüber hinaus sollte die Bedeutung einzelner durch die Infektion induzierter Mediatoren ermittelt werden. Deshalb wurden Inhibitionsexperimente sowie Stimulationsversuche mit verschiedenen Zytokinen durchgeführt.

Ein weiteres Anliegen bestand in der Identifizierung von intrazellulären Regulationsmechanismen der Kollagensynthese bei infizierten Zellen. Hierfür sollte mit Hilfe von RNA-Interferenz die Rolle des Transkriptionsfaktors CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (CEBP- $\beta$ ) bei der Signaltransduktion ermittelt werden, da dieser für die Kollagenregulation ein entscheidendes Signalmolekül zu sein scheint.

## 2. Material und Methoden

### Zellkulturen und Kultivierungsbedingungen

Humane bronchiale und vaskuläre glatte Muskelzellen (SMC) sowie Hautfibroblasten (DF-Zellen) und Nasenepithelzellen (NEp-Zellen) wurden von PromoCell bezogen und zunächst mit dem entsprechenden Wachstumsmedium vermehrt. SMC und Fibroblasten wurden dann in Medium mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS) von Biochrom und 7,5 % DMSO (Sigma) aufgenommen und für die spätere Verwendung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. NEp-Zellen wurden ohne Zwischenkonservierung verwendet. Die Versuche wurden mit Zellen der Passagen 4-12 durchgeführt. Die permanenten Zelllinien WISH (Epithelzellen) und U-937 (Monozyten) sind am Institut für Medizinische Mikrobiologie etabliert.

Alle Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C sowie 90 % Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> ohne Zusatz von Antibiotika subkultiviert. Die Passagierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte durch Absaugen des Mediums, einmaliges Spülen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und Zugabe von 1,5 ml Trypsin-EDTA (Biochrom) zur Ablösung von der Oberfläche. Nach etwa 10 min Inkubation im Brutschrank wurde das Trypsin durch Zugabe von 3 ml Minimalmedium + 10 % FCS inaktiviert und die Suspension für 5 min bei 250g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgossen, das Zellpellett mit Wachstumsmedium resuspendiert sowie die Zellen zur weiteren Vermehrung erneut in Zellkulturflaschen gesät. Bei nicht adhätierenden Zellen (U-937) entfiel die Trypsinbehandlung und die Zellsuspension wurde hier bei 800g zentrifugiert. Die Mykoplasmen-Freiheit der Zellkulturen wurde regelmäßig durch eine DAPI-Färbung kontrolliert, bei der neben der DNA der Zellkerne auch bakterielle DNA im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird (Russell *et al.*, 1975).

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden von einem gesunden Spender gewonnen. Hierfür wurden 20 ml frisches heparinisiertes Blut (2500 Einheiten/ml) im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Für die Separation wurden in Zentrifugenröhrchen jeweils 3 ml „Ficoll“-Trennlösung (Biochrom) vorgelegt und mit 6 ml des verdünnten Blutes überschichtet. Nach Zentrifugation bei 800g für 20 min befindet sich das „Ficoll“ über den Erythrozyten/Granulozyten und die PBMC schichten sich zwischen „Ficoll“ und dem Plasma-Überstand ein. Dieser „Buffy coat“ wurde bei jedem Röhrchen vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt, welches mit

PBS aufgefüllt und bei 400g für 15 min zentrifugiert wurde. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet vorsichtig ohne Suspendierung einmal mit PBS gewaschen, nochmals bei 400 g für 15 min zentrifugiert und in Minimalmedium + 1 % FCS aufgenommen.

Für die Versuche wurden SMC, DF-, NEp- und WISH-Zellen mit 3 ml Wachstumsmedium in 6-well-Kulturplatten (35 mm-wells) gesät und vermehrt. Subkonfluente Zellen wurden vor der Infektion für 24-48 h mit Minimalmedium + 1 % FCS kultiviert. Bei einem einschichtigen Zellrasen („Monolayer“) wird bei Konfluenz eine Zellzahl von  $\leq 10^6$  erreicht. Einige Experimente wurden mit Deckglasröhrchen (12 mm-Deckgläser) durchgeführt, in denen die Zellen mit 0,5 ml Medium kultiviert wurden. Bei Konfluenz beträgt die Zellzahl hier  $\leq 10^5$ . PBMC und U-937-Zellen wurden nach der Zählung mit einer Neubauer-Kammer auf eine Zellzahl von  $10^6/\text{ml}$  eingestellt (Minimalmedium + 1 % FCS) und in der entsprechenden Menge ausgesät. Diese Zellen wurden anschließend für 24 h im Brutschrank inkubiert und dann infiziert.

## Kulturmedien

Für die Kultivierung von NEp-Zellen und SMC wurde jeweils spezielles Wachstumsmedium (PromoCell) verwendet und mit den mitgelieferten Supplementen versetzt. Alle anderen Zellen wurden mit dem Minimalmedium „OptiMEM I“ (Gibco) mit stabilem Glutamin unter Zusatz von Hitze-inaktiviertem FCS (56°C für 30 min) kultiviert.

### ***„OptiMEM I“ für WISH-, DF- und U-937- Zellen***

+ 10 % FCS

### ***Epithelzell-Wachstumsmedium***

+ 0,4 % Bovine Pituitary Extract (BPE)  
 + 0,5 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF)  
 + 5 µg/ml Insulin  
 + 0,5 µg/ml Hydrocortison  
 + 0,5 µg/ml Epinephrin  
 + 6,7 ng/ml Trijodothyronin  
 + 10 µg/ml Transferrin  
 0,1 ng/ml Retinsäure

**SMC-Wachstumsmedium 2**

- + 5 % FCS
- + 0,5 ng/ml EGF
- + 2 ng/ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)
- + 5 µg/ml Insulin

**Chlamydien und Infektion der Zellen**

Für alle Versuche wurde der *Chlamydia pneumoniae* Stamm TW-183 verwendet. Die Stammhaltung erfolgt am Institut für Medizinische Mikrobiologie Jena. Zur Vermehrung wurden die Chlamydien auf konfluente Zellrasen von Buffalo Green Monkey (BGM)-Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen inokuliert und bei 4000g und 35°C für 30 min zentrifugiert. Danach wurde das Inokulum entfernt, durch das serumfreie Universalmedium „PANSERIN 401“ (PAN Biotech) ersetzt und die infizierten Kulturen für 48-72 h im Brutschrank inkubiert. Die Ernte erfolgte durch Abschaben des Zellrasens und Suspendierung in Erhaltungsmedium (Saccharose-PBS + 2 % FCS). Nach Ultraschallbehandlung wurde die Suspension bei 800 g zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert. Der Überstand mit Elementarkörpern wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Kontrolle auf Mykoplasmen geschah über Kultur und PCR durch das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Jena sowie mit dem „MycoDtect DNA array“ von Greiner Bio-One.

Der Chlamydien-Titer wurde in BGM-Zellen bestimmt. Dafür wurden 10 µl der Chlamydien-Stammsuspension in 15 ml PBS verdünnt und 10-200 µl dieser Lösung zusammen mit 400 µl PBS in Deckglasröhrchen mit kultivierten BGM-Zellen pipettiert, die anschließend durch Zentrifugation infiziert wurden. Nach 48 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Anzahl der gebildeten Inklusionen pro Deckglas mittels Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-konjugierter gattungsspezifischer Antikörper gegen chlamydiales LPS („IMAGEN“-Test; DakoCytomation) ermittelt. Hierfür wurden 10 Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert mit einem Faktor multipliziert, der spezifisch für das verwendete Objektiv ist. Durch weitere Multiplikation mit den Verdünnungsfaktoren ergaben sich die Titer der verwendeten Stammsuspensionen als Anzahl der Einschlusskörperbildenden Einheiten (IFU) pro ml. Diese lagen im Bereich von 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> IFU/ml.

Die Infektion der Zellen erfolgte mit 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> IFU/well. Die Infektionsmultiplizität (MOI), welche die Anzahl der IFU/Zelle angibt, beträgt hierbei 1-10. Nicht infizierte, aber

ansonsten gleichbehandelte Zellen, dienten als Kontrolle (Scheininfection). Bei einigen Experimenten erfolgte die Inaktivierung der Chlamydien-Suspension bei 75°C oder unter einer UV-Lampe (30 W auf 30 cm) für jeweils 25 min. Für die Infektion wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch 2 ml serumfreies „OptiMEM“ ersetzt. In einer Verdünnungsreihe wurde die Chlamydien-Stammsuspension mit dem gleichen Medium auf die entsprechenden Infektionsdosen (IFU/ml) eingestellt und 1 ml des Inokulums tropfenweise zu den Zellen gegeben. In die nicht zu infizierenden wells wurden 3 ml Medium pipettiert. Nach Zentrifugation bei 4000 g und 37°C für 45 min wurde das Inokulum entfernt, durch Minimalmedium (1 % FCS) ersetzt und die Kulturen bis zur Probenahme im Brutschrank inkubiert. Bei PBMC und U-937-Zellen erfolgte die Infektion mit Medium + 1 % FCS, da das Inokulum nach der Zentrifugation nicht entfernt wurde. Hierfür wurde zu den ausgesäten und vorinkubierten Zellen je 1 ml Chlamydien-Suspension und Medium, zu den Kontrollzellen hingegen nur 2 ml Medium, hinzugefügt.

### **Bestimmung der Infektionsrate**

Zur Bestimmung der Infektionsrate wurden die adhärennten Zellen in Deckglasröhrchen kultiviert und mit den für die Versuche verwendeten MOI infiziert. Nach 48 h wurde mit Hilfe des bereits für die Titerbestimmung verwendeten FITC-markierten LPS-Antikörpers („IMAGEN“-Test) die Anzahl der gebildeten Inklusionen pro Deckglas ermittelt. Die prozentuale Infektionsrate ergibt sich nach der Formel  $\text{Inklusionen/Gesamtzellzahl} \times 100$ . Die Monozyten wurden in 12-well Platten kultiviert und 48 h nach der Infektion mit einer Zytocentrifuge Hettich „EBA 12“ auf Objektträger zentrifugiert. Dadurch wurden die Zellen als Monolayer-Schicht auf eine definierte Stelle des Objektträgers aufgebracht, die der Fläche eines 12 mm-Deckglases entspricht. Die überschüssige Flüssigkeit wurde von einer Filterkarte absorbiert.

### **Inkubation von Zellen mit konditioniertem Medium**

Die Überstände von infizierten und nicht infizierten Zellen wurden 48 h nach der Infektion abpipettiert und bei 20000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert, um partikuläre Bestandteile und Chlamydien-Elementarkörper zu entfernen. Die zuvor bei 4000g zentrifugierten Zellen wurden mit 2 ml dieser Überstände inkubiert. Zur Kontrolle der Chlamydienfreiheit wurden BGM-Zellen mit so behandelten Überständen zentrifugiert und nach 24 h sowie 48 h ein Chlamydien-Fluoreszenztest durchgeführt, der negativ ausfiel.



### MMP-1 Neutralisation

Im Kulturüberstand von Fibroblasten wurde die Aktivität der Matrixprotein-abbauenden Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP-1) durch einen spezifischen Antikörper (R&D Systems) inhibiert. Laut Hersteller inhibieren 20 µg Ak, die mit 1 µg des aktiven Enzyms vorinkubiert wurden, den Abbau von Kollagen I zu mehr als 80 %. Für die Versuche wurden Endkonzentrationen von 0,1 µg/ml und 1 µg/ml eingesetzt, da in Überständen von infizierten SMC maximal 5 ng/ml aktive MMP-1 gefunden werden konnte (Rödel *et al.*, 2003).

### Zytokin-Neutralisation

Zur Neutralisation der Bioaktivitäten der Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-8, GRO- $\alpha$ , bFGF und IFN- $\beta$  im Kulturüberstand von infizierten Zellen wurden die in *Tab. 2* angegebenen Antikörper in PBS gelöst und in den Konzentrationen 0,3 µg/ml und 1 µg/ml eingesetzt. Die Zugabe erfolgte unmittelbar nach der Infektion. Konditioniertes Medium von infizierten Zellen wurde nach der Zentrifugation für 1 h im Brutschrank mit den Antikörpern vorinkubiert. Bei der Neutralisationsdosis 50 (ND<sub>50</sub>) werden spezifische Zytokineffekte, wie Zellproliferation oder Chemotaxis bei einer empfänglichen Zelllinie um 50 % reduziert. ND<sub>50</sub> wird als Konzentrationsbereich angegeben, da Bioaktivitäten stets einer gewissen Schwankungsbreite unterliegen.

**Tab. 2:** Antikörper für die Zytokin-Neutralisation

Antikörper	Hersteller	ND <sub>50</sub>
Anti-IL-1 $\alpha$	R&D Systems	4-20 ng/ml
Anti-IL-8	R&D Systems	0,1-0,5 µg/ml
Anti-GRO- $\alpha$	R&D Systems	0,03-0,15 µg/ml
Anti-IFN- $\beta$	R&D Systems	0,05-0,2 µg/ml
Anti-bFGF	R&D Systems	0,08-0,4 µg/ml

### **COX-2-Inhibition**

Zur Inhibition der Prostaglandin-Synthese erfolgte sofort nach der Infektion der Zellen die Blockierung des Enzyms Zyklooxygenase 2 (COX-2) durch Zusatz von 10  $\mu$ M des selektiven COX-2 Inhibitors NS-398 (Qbiogene-Alexis) zum Kulturmedium. Zur Kontrolle wurde nach 24 h die Konzentration von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in den Kulturüberständen bestimmt. Der hierfür verwendete ELISA wird an anderer Stelle ausführlicher beschrieben.

### **RNA-Interferenz**

Die Inhibition der Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP- $\beta$  erfolgte mittels RNA-Interferenz. Dieser Mechanismus wird in vivo von Eukaryonten zur Virusabwehr und Genregulation verwendet (Fire *et al.*, 1998; Hamilton & Baulcombe, 1999). Hierbei wird lange (>30 Nukleotide) doppelsträngige RNA (dsRNA) durch das RNase III-ähnliche Enzym Dicer in kurze RNA-Duplexe aus 19-21 Nukleotiden gespalten. Diese small interfering RNA (siRNA) wird in den RNA-induced silencing complex (RISC) eingebaut, der eine Endoribonuklease enthält und nun sequenzspezifisch mRNA-Transkripte über Basenpaarung mit dem komplementären siRNA Antisense-Strang binden kann. Die gebundene mRNA wird abgebaut und das entsprechende Protein nicht mehr synthetisiert. Bei Säugerzellen induziert lange doppelsträngige RNA jedoch eine starke antivirale Antwort mit unspezifischer Inhibition der Proteinsynthese, die bei der Verwendung von siRNA ausbleibt (Elbashir *et al.*, 2001).

Für die Versuche wurden subkonfluente DF-Zellen (ca. 80 % Konfluenz) nach Mediumwechsel mit 150-300 ng (5-10 nM Endkonzentration) C/EBP- $\beta$  siRNA (Qiagen) unter Verwendung des „HiPerfect“ Transfektionsreagenzes der gleichen Firma nach Herstellerprotokoll transfiziert. Als Negativkontrolle diente eine zu keinem bekannten Gen homologe siRNA (Qiagen „AllStars“), die keinen Abbau zellulärer mRNA induziert. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen nach dem bereits beschriebenen Schema infiziert.

### **Stimulation von Zellen mit Zytokinen**

Die in Tab. 3 aufgeführten rekombinanten Zytokine (PromoKine) wurden in PBS gelöst und den Zellkulturen unmittelbar nach der Zentrifugation zugegeben. Die eingesetzten Konzentrationen wurden aus Publikationen entnommen oder durch Vorversuche ermittelt,

in denen die Wirkung von verschiedenen Zytokin-Konzentrationen auf die mRNA-Synthese der untersuchten Matrixproteine getestet wurde.

**Tab. 3:** Verwendete Zytokine

Zytokin	spezifische Aktivität (U/mg)	eingesetzte Konzentration
TNF- $\alpha$	$\geq 2 \times 10^7$	10 ng/ml (200 U/ml)
IFN- $\beta$	$\geq 3 \times 10^7$	0,07-7 ng/ml (2-200 U/ml)
IFN- $\gamma$	$\geq 2 \times 10^7$	10 ng/ml (200 U/ml)
TGF- $\beta$ 1	$\geq 2 \times 10^7$	10 ng/ml (200 U/ml)
IL-1 $\alpha$	$\geq 1 \times 10^9$	0,002-2 ng/ml (2-2000 U/ml)
IL-10	$\geq 5 \times 10^5$	20 ng/ml (10 U/ml)

### Stimulation von Zellen mit chlamydialem Hsp60

Für die Versuche wurde rekombinantes Hitzeschockprotein 60 vom *C. trachomatis* L2 Stamm 434 B (cHsp60) verwendet. Die extrahierte bakterielle DNA diente als Template für die Amplifikation der groEL-ähnlichen cHsp60-Sequenz, welche mit den folgenden Primern durchgeführt wurde:

5'-GCATGCTAAGGAGCGCATCAATGGTCGCT-3' (Sense)

5'-AGATCTTCCTGCGCCAGGCATTGCTGGAGC-3' (Antisense)

Das amplifizierte DNA-Fragment wurde im Vektor pGEM T easy (Promega) vorkloniert. Anschließend wurde das Gen mit Hilfe der Enzyme Sph I und Bgl II herausgeschnitten und in den Multicloning site des Plasmids pQE70 (Qiagen) ligiert, das mit den gleichen Enzymen verdaut wurde. Das vom Plasmid pCHSP\_pQE70 kodierte cHsp60 besitzt am C-terminalen Ende sechs zusätzliche Histidinreste (His-tag Fusionsprotein), die eine einfache Aufreinigung ermöglichen. Dieses Plasmid wurde in den *Escherichia coli* Stamm M15[REP4] (Qiagen) transformiert.

Für die Expression des Proteins wurde der transformierte *E. coli* Stamm zunächst für 3 h bei 37°C in 200 ml LB-Medium unter Zusatz von 100  $\mu$ g Ampicillin und 25  $\mu$ g Kanamycin kultiviert. Nach Induktion der cHsp60-Proteinsynthese durch das Induktionsreagenz Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurde die Inkubation über Nacht fortgesetzt und die Suspension am nächsten Tag bei 11000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das

Pellet wurde in 10 ml TRIS (50 mM)/NaCl (150 mM)-Puffer (pH 7,5) resuspendiert und Lysozym (1 mg/ml) hinzugefügt. Daraufhin erfolgte die Lyse der Bakterien durch Ultraschallbehandlung der auf Eis gelagerten Suspension (10 Zyklen je 1 min). Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer bei 15000 g für 30 min wurde der Überstand durch Affinitätschromatografie über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose (Qiagen) fraktioniert. Nach dem Waschen der Säule mit 20 ml PBS wurde das gebundene cHsp60 mit Imidazol (500 mM) eluiert. Die Eluate wurden gesammelt und für 48 h bei 4°C gegen PBS dialysiert. Die Reinheit der Proteinfractionen und die Identität des rekombinanten Proteins wurden nach Gel-Elektrophorese und Western-Blot mit Ponceaurot (Roth) sowie einem Antikörper gegen chlamydiales Hsp60 (Abcam) überprüft.

Die Konzentration des Proteins wurde mit einem Bicinchoninsäure (BCA)-Assay (Sigma) unter Verwendung eines Rinderserumalbumin (BSA)-Standards bestimmt. Hierfür wurden 5 ml „Bicine-Reagenz“ mit 10 µl CuSO<sub>4</sub>-Lösung (4% w/v) gemischt und 100 µl dieser Lösung zu 10 µl Proteinlösung in einer Mikrotiterplatte pipettiert. Cu<sup>2+</sup>-Ionen werden durch Proteine zu Cu<sup>1+</sup>-Ionen reduziert, die mit BCA einen blauen Komplex bilden. Die Intensität der Färbung ist proportional zur Proteinkonzentration. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 462 nm mit einem Photometer „Spectra Rainbow“ (SLT Labinstrumente) gemessen. Die so bestimmte mittlere Konzentration des rekombinanten cHsp60 betrug 1,0 mg/ml. Für die Zellstimulation wurde die Proteinlösung sterilfiltriert und den Zellen nach der Zentrifugation in einer Endkonzentration von 0,1-20 µg/ml hinzugefügt.

### **RNA-Isolierung und RT-PCR**

Zur RNA-Isolierung wurde das Qiagen „RNeasy Mini Kit“ verwendet und nach der Vorschrift des Herstellers verfahren. Die Zellen wurden 24 h nach Versuchsbeginn, bei Zeitreihen nach den entsprechend angegebenen Zeiträumen, mit PBS gewaschen und mit dem mitgelieferten Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber gesammelt, in ein Reaktionstube pipettiert und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Isolierung geschah durch die Bindung der mit Ethanol versetzten Total-RNA an eine Silica-Membran. Kontaminationen wurden durch mehrere Waschschriffe entfernt und die gereinigte RNA konnte mit Wasser wieder eluiert werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem UV/VIS Spektrophotometer „Ultrospec 2000“ (Pharmacia Biotech). Die Reinheit der RNA lässt sich mit Hilfe

des Verhältnisses der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) beurteilen. Reine RNA hat ein  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis von 1,9-2,1. Werte unter 1,9 zeigen eine Kontamination mit Proteinen an. Es wurden nur Proben mit  $A_{260}/A_{280}$ -Werten  $\geq 1,9$  verwendet.

Für die reverse Transkription wurde das Promega „Reverse Transcription System“ verwendet und 1 µg RNA eingesetzt. Die Umschreibung in cDNA geschah mit Hilfe der reversen Transkriptase des Vogel-Myeloblastose-Virus (AMV-RT). In der nachfolgenden PCR wurde 1 µl cDNA (50 ng RNA) in einem 25 µl Reaktionsansatz mit den entsprechenden Oligonukleotid-Primern (Tab. 4) amplifiziert. Die Primer wurden vom Institut für Virologie des Universitätsklinikums Jena (Herr Dr. E. Birch-Hirschfeld) synthetisiert. Der Reaktionsansatz für eine Probe setzte sich wie folgt zusammen:

14,88 µl	DEPC-Wasser (Fermentas)
5,0 µl (7,5 mM)	MgCl <sub>2</sub> -Puffer (Promega)
0,5 µl (10 mM)	je dNTP (Promega)
1,0 µl (10 mM)	je Primer
0,125 µl (0,625 U)	GoTaq <sup>®</sup> DNA-Polymerase (Promega)

Die Amplifikation fand in einem Biometra „TRIO-Thermoblock“ statt. Einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 7 min folgten 20-35 Zyklen mit jeweils 95°C für 30 s, Annealingtemperatur für 1 min und 72°C für 1 min sowie abschließend 72°C für 10 min. Die Amplifikate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 70 V in einem Agarsegel (1 %), welches den Cyanin-Farbstoff „SYBR Green I“ (Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:15000 enthält. Als Elektrophorese-Puffer wurde TAE-Puffer (Fermentas) verwendet. In jede Geltasche wurden 5 µl Probe, vermischt mit 3 µl OrangeG-Laufpuffer (10 ml H<sub>2</sub>O, 10 ml Glycerin, 25 mM EDTA, 0,5 % [w/v] OrangeG [Sigma]), pipettiert. Eine DNA-Leiter (Bio-Rad) wurde als Längenstandard stets mitgeführt. Die Banden wurden mit dem Transilluminator „Image Master<sup>®</sup> VDS“ (Pharmacia Biotech) visualisiert und fotografiert. Die Spezifität der Amplifikation wurde durch die Sequenzierung der aufgetrennten PCR-Produkte bestätigt. Als interne Kontrolle diente die Expression der Pyruvat-Dehydroxygenase (PDH), deren mRNA-Synthese innerhalb eines Versuchsansatzes konstant sein soll. Da die Template-DNA im Bereich der amplifizierten RNA-Sequenz mehrere Introns enthält, können DNA-Kontaminationen durch Detektion eines zweiten PCR-Produkts (180 bp) festgestellt werden (Rolfs *et al.*, 1992).

**Tab. 4:** Primersequenzen für die RT-PCR der untersuchten Gene (S - Sense Strang, AS - Antisense Strang)

Spezifität	Primerpaar	Produkt- größe	Annealing- temperatur	Referenz
Col Ia1	S 5'-CCCACCAATCACCTGCGTACAGA-3' AS 5'-TTCTTGGTCGGTGGGTGACTCTGA-3'	209 bp	66°C	Nusgens <i>et al.</i> (2001)
Col IIIa1	S 5'-GAGATGTCTGGAAGCCAGAACCAT-3' AS 5'-GATCTCCCTTGGGGCCTTGAGGT-3'	207 bp	66°C	Nusgens <i>et al.</i> (2001)
Col IVa1	S 5'-GCTCACCAGGACCAGTGGGT-3' AS 5'-TCACCTTTAGGTCCTGGCTG-3'	310 bp	60°C	Rinaldi <i>et al.</i> (2001)
Col Va1	S 5'-GGATGAGGAGGTGTTTGA-3' AS 5'-GCCCCTTCACTGGTTTCA-3'	345 bp	53°C	Nakatani <i>et al.</i> (2001)
FN	S 5'-CCGTGGGCAACTCTGTC-3' AS 5'-TGCGGCAGTTGTCACAG-3'	438 bp	54°C	Han <i>et al.</i> (2005)
MMP-1	S 5'-ATGCGCACAAATCCCTTCTACC-3' AS 5'-TTTCCTCAGAAAGAGCAGCATCG-3'	247 bp	60°C	von Lampe <i>et al.</i> (2000)
IFN-β	S 5'-GATTCATCTAGCACTGGCTGG-3' AS 5'-CTTCAGGTAATGCAGAATCC-3'	186 bp	55°C	Li <i>et al.</i> (1998)
IL-8	S 5'-CTTGGCAGCCTTCCTGATTT-3' AS 5'-CAGCCCTCTTCAAAAACCTC-3'	263 bp	55°C	Xue <i>et al.</i> (2002)
IDO	S 5'-ACAGACCACAAGTCACAGCG-3' AS 5'-AACTGAGCAGCATGTCCTCC-3'	662 bp	60°C	Nagineni <i>et al.</i> (1996)
COX-2	S 5'-CGAGGTGTATGTATGAGTGTG-3' AS 5'-TCTAGCCAGAGTTTCACCGTA-3'	540 bp	60°C	Subbarayan <i>et al.</i> (2001)
C/EBP-β	S 5'-ACAGCGACGAGTACAAGATCC-3' AS 5'-GCAGCTGCTTGAACAAGTTCC-3'	195 bp	57°C	Homma <i>et al.</i> (2006)
PDH	S 5'-GGTATGGATGAGGACCTGGA-3' AS 5'-CTTCCACAGCCCTCGACTAA-3'	105 bp	60°C	Rolfs <i>et al.</i> (1992)

Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der Bandenvolumen (mittlere optische Dichte × Fläche) mit der Software „Multi-Analyst“ (Bio-Rad) und Normalisierung gegen den Wert der PDH-Bande derselben Probe.

### Western-Blot

Die Probenahme für den Western-Blot erfolgte 48 h nach Versuchsbeginn oder bei Zeitreihen nach den entsprechend angegebenen Zeiträumen. Nach Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen mit 50 µl Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffer (s. u.) lysiert und die Zell-Suspension für 1 h bei 4°C in einem Thermoschüttler inkubiert. Nach kurzer Durchmischung mit einer Pipette wurden die Proben für 5 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Für die Elektrophorese wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Puffer (Bio-Rad) + 5 % β-Mercaptoethanol (Bio-Rad) gemischt und für 3 min bei 95°C denatu-

riert. Die Auftrennung der Matrixproteine erfolgte in einem 5 %igen Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gel bei 150 V. Für CEBP- $\beta$  und cHsp60 wurde ein 10 %iges Gel verwendet. Als Laufpuffer diente ein TRIS/Glyzin/SDS-Elektrophoresepuffer (pH 8,3) von Fermentas. Nach der Equilibrierung des Gels für 15 min in Kathodenpuffer (s. u.) wurden die Proteine in einem „Semidry-Transblot-System“ (Bio-Rad) bei 10 V für 120 min mit Anodenpuffer 1 und 2 (s. u.) sowie Kathodenpuffer auf Nitrozellulose (Bio-Rad) transferiert.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

***RIPA-Puffer***

100 ml	H <sub>2</sub> O dest.
0,877 g	NaCl
0,788 g	TRIS-Hydrochlorid
1,0 g	Deoxycholsäure
0,1 g	SDS
1,0 ml	Triton X100

Zusatz von Proteinase-Inhibitoren vor Probenahme:

100 $\mu$ g/ml	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Serva)
2 $\mu$ g/ml	Leupeptin (Serva)
50 $\mu$ g/ml	Aprotinin (Sigma)

***Anodenpuffer 1***

0,3 M	TRIS
0,192 M	Glyzin
20 %	Methanol (v/v)

***Anodenpuffer 2***

0,025 M	TRIS
0,192 M	Glyzin
20 %	Methanol (v/v)

***Kathodenpuffer***

0,025 M	TRIS
0,192 M	Glyzin
0,1 %	SDS (w/v)

Für die Entwicklung der Blots wurden die unspezifischen Membranbindungsstellen zunächst für 2 h mit Blocking-Puffer (4 g BSA in 100 ml PBS) blockiert und danach mit den entsprechenden Primärantikörpern (*Tab. 5*), verdünnt mit Blocking-Puffer, für weitere 2 h auf einem Taumler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TRIS-Puffer + Detergenz (TBS-Tween; Sigma) erfolgte für 1 h die Inkubation mit einem alkalische Phosphatasegekoppelten Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Dianova) in einer Verdünnung von 1:5000 mit Blocking-Puffer. Nach wiederum dreimaligem Waschen mit TBS-Tween wurden die Blots kurz in PBS gelegt und mit dem Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid („SigmaFast“; Sigma) entwickelt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach Abgießen des Substrats durch ausgiebiges Spülen mit Leitungswasser.

**Tab. 5:** Antikörper für Western-Blot

Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
Anti-Kollagen I, III, IV, V	Rockland	1:1000
Anti-Fibronektin	Santa-Cruz	1:200
Anti-C/EBP- $\beta$	Santa-Cruz	1:200
Anti-Chlamydien-Hsp60	Abcam	1:5000

## ELISA

### *TGF- $\beta$ 1*

Mit einem Testkit von Biosource wurde die Konzentration von TGF- $\beta$ 1 im Zellkulturmedium bestimmt. Bei diesem Test sind die wells mit einem für TGF- $\beta$ 1 spezifischen Capture-Antikörper (Ak) beschichtet. Das in der Probe enthaltene aktive Zytokin bindet simultan an den Capture-Ak und an einen gelösten Biotin-konjugierten Antikörper der gleichen Spezifität („Sandwich-ELISA“). Zur Bestimmung der Gesamt-TGF- $\beta$ 1-Konzentration wurde latentes TGF- $\beta$ 1 durch vorherige Zugabe einer Extraktionslösung aktiviert. Nach der Inkubation mit Streptavidin-Meerrettichperoxiase (HRP) und Hinzufügen des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) findet eine Farbreaktion statt, die nach ca. 20 min mit 0,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt wurde. Die Auswertung der Farbintensität erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Als Leerwert diente PBS. Die Zytokin-Konzentration wurde bei diesem und den folgenden Assays nach Erstellung einer Standardkurve und



anschließender linearer Regression aus den um die Leerwerte korrigierten Absorptionen berechnet. Die Sensitivität dieses Tests liegt unter 15 pg/ml. Bei der Durchführung wurde nach der Anweisung des Herstellers verfahren.

### ***IL-1 $\alpha$ und IL-1 $\beta$***

Zur Bestimmung von IL-1 $\alpha$  wurde ein Test von PromoKine verwendet. Auch hier wurden die Proben zusammen mit einem Biotin-konjugierten Antikörper in die vorbeschichteten wells pipettiert. Für den IL-1 $\beta$ -ELISA (BioSource) mussten zuerst die wells einer 96-well „Maxisorb“-Platte (Nunc) über Nacht bei 4°C mit dem Capture-Ak inkubiert werden. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte die Zugabe der Proben. Die weiteren Schritte sind bei beiden Tests identisch und entsprechen dem TGF- $\beta$ 1-Assay. Die minimal detektierbaren Konzentrationen betragen <1 pg/ml (IL-1 $\alpha$ ) bzw. 8 pg/ml (IL-1 $\beta$ ).

### ***PGE<sub>2</sub>***

Bei diesem Test (R&D Systems) handelt sich um einen kompetitiven ELISA. Hierbei konkurrieren PGE<sub>2</sub> der Probe und alkalische Phosphatase-konjugiertes PGE<sub>2</sub> um Bindungsstellen an einem in den wells gebundenen PGE<sub>2</sub>-Ak. Nach Zugabe des Substrats p-Nitrophenylphosphat (pNPP) wird die Intensität der Farbreaktion bei 405 nm gemessen. Die Absorption ist umgekehrt proportional zur PGE<sub>2</sub>-Konzentration in der Probe. Die Sensitivität des Tests liegt unter 35 pg/ml. Auch hier wurde nach Herstellervorschrift gearbeitet.

### **Konfokale Laserscanningmikroskopie**

Die bildliche Darstellung der untersuchten extrazellulären Matrixproteine erfolgte mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanningmikroskopie. Konfokale Mikroskope sammeln das Fluoreszenzsignal selektiv aus der Fokusebene, während Signale aus anderen Präparatebenen ausgeblendet werden. Dies führt zu schärferen und kontrastreichen Abbildungen. Die Bilder entstehen durch das zeilenweise Abtasten der Probe mit einem fokussierten Laserstrahl.

Für die Untersuchungen wurden DF-Zellen auf Deckgläsern kultiviert, mit einer MOI von 5 infiziert und nach 48 h mit Methanol fixiert. Nach einem Blockierungsschritt folgte die Inkubation mit den bereits beschriebenen Antikörpern gegen Kollagene (Verdünnung 1:50) und Fibronektin (Verdünnung 1:10) bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer.

Danach wurden die Präparate für 2 h mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (DakoCytomation; Verdünnung 1:100) inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Deckgläser dreimal in PBS gewaschen. Die weitere Präparation übernahm Frau I. Bernhardt vom Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums Jena. Die Deckgläser wurden zunächst dreimal für jeweils 10 min in TBS gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 0,05 M Phosphatpuffer (PB) folgte für 1 h die Inkubation mit dem Farb-reagenz (20 ml 0,05 M PB; 200 µl Tween 20; 300 µl CHAPS; 3,33 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 50 µl Farbstoff). Der als Peroxidasesubstrat dienende Fluoreszenzfarbstoff (E)-N-Ethoxyethyl-4-[2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]chinoliniumbromid (heterozyklisches 4-Hydroxystyren-Derivat) ist eine Eigenentwicklung des Instituts für Anatomie II mit einer hohen Sensitivität und geringen Hintergrundfluoreszenz (Krieg *et al.*, 2007). Nach jeweils dreimal waschen in PB (2 min) und 1 N HCl (1 min) folgte die Entwässerung in einer Alkohol/Xylol-Reihe und schließlich die Eindeckelung mit Entellan. Die Präparate wurden mit einem Laserscanningmikroskop Leica „TCS SP5“ mikroskopiert. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit der 488 nm Laserlinie des Argon-Ionen Lasers angeregt und das Fluoreszenzsignal unter Verwendung eines Bandfilters (500-550 nm) im Grünkanal detektiert. Die Bilder wurden mit dem Öl-Immersionsobjektiv „HCX PL APO 63x/1,4-0,6“ aufgenommen.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Intensität erfolgte nach der Konvertierung der Aufnahmen in Graustufenbilder ebenfalls mit dem Programm „Multi-Analyst“. Hierfür wurde jedes Bild in vier Quadranten unterteilt. Der vom Programm errechnete mittlere Graustufenwert jedes Quadranten wurde prozentual in das Verhältnis zum höchsten Wert (maximale Fluoreszenzintensität) jedes Bilderpaares (nicht infiziert/infiziert) gesetzt und beschreibt somit die mittlere relative Intensität des Fluoreszenzsignals.

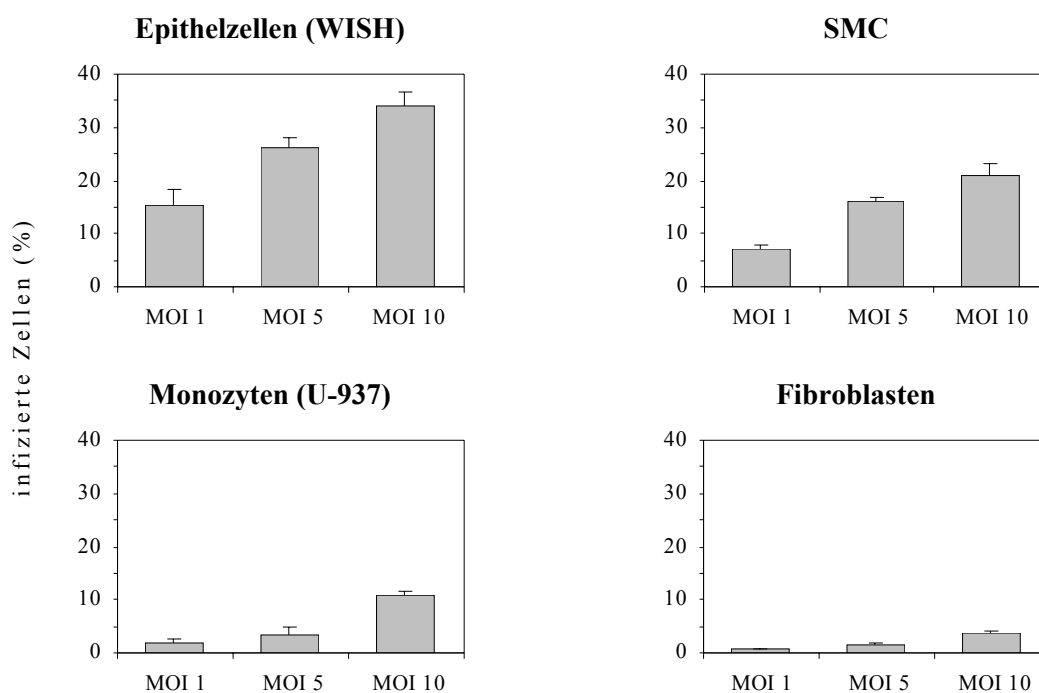
### Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Statistikpaket „SSC-Stat 2.18“ der Universität Reading (Großbritannien), welches für das Microsoft-Programm „Excel“ als kostenloses Add-in im Internet zur Verfügung steht. Für den Vergleich von zwei Erwartungswerten wurde der Student t-Test angewendet. Bei transformierten Relativwerten wurde ein 1-Stichproben t-Test für den Vergleich eines Erwartungswertes mit einer Konstanten durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Die Nullhypothese wurde bei p-Werten  $\leq 0,05$  abgelehnt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Infektionsraten der untersuchten Zelltypen

Die Infektionsraten stiegen generell mit der Infektionsdosis und waren bei den epithelialen WISH-Zellen mit durchschnittlich 15-34 % im Vergleich zu den anderen Zelltypen am höchsten. Bei SMC waren etwa 7-22 % der Zellen infiziert. Bei Monozyten (U-937-Zellen) lagen die Infektionsraten mit 2-11 % deutlich niedriger und es konnten hier auch kaum typische Inklusionen, sondern meistens nur Ansammlungen von punktförmigen chlamydien-spezifischen Strukturen nachgewiesen werden. Die wenigsten Einschlüsse wurden bei Fibroblasten gezählt. Die Infektionsrate betrug hier maximal 4 % bei der höchsten Infektionsdosis (Abb. 3).

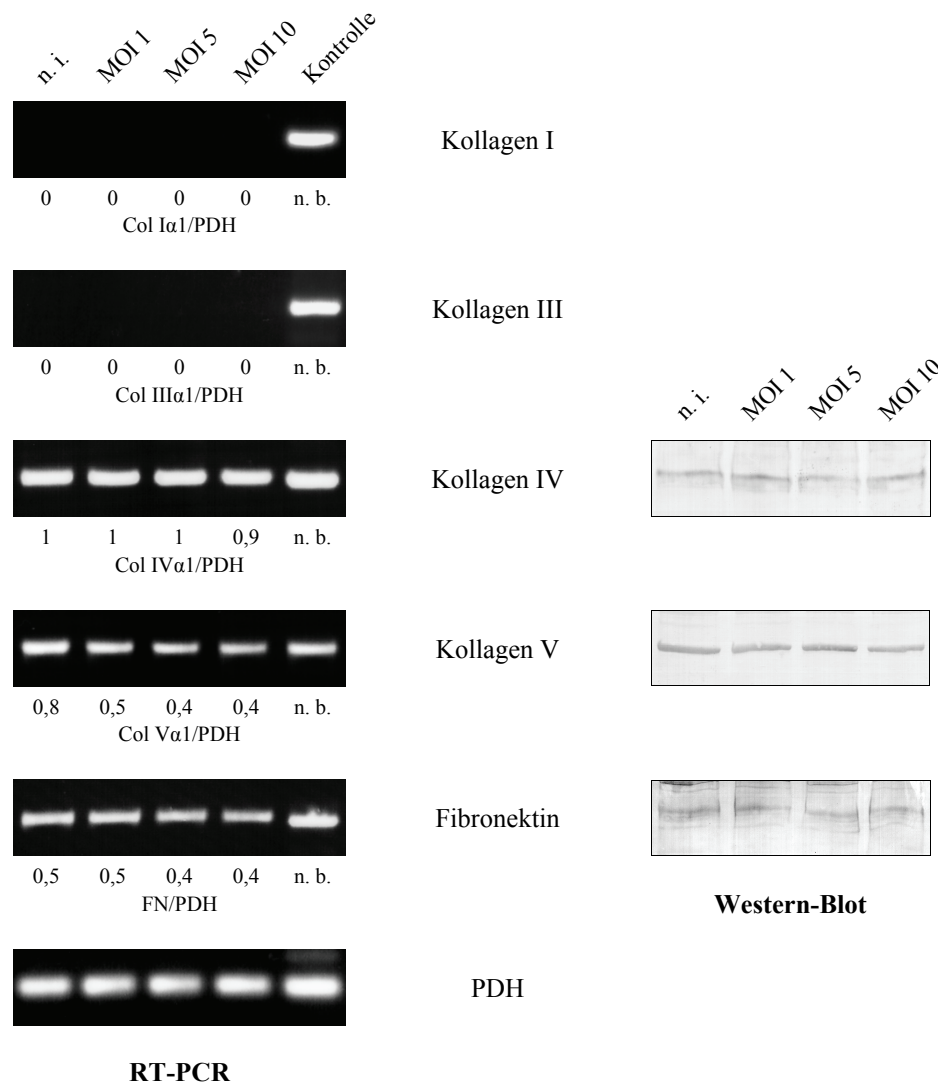


**Abb. 3:** Anteil der Zellen mit Inklusionen nach Infektion der für die Versuche verwendeten Zelltypen mit unterschiedlichen MOI von *C. pneumoniae*. Bei Monozyten waren meistens keine typischen Einschlusskörper, sondern nur Ansammlungen von chlamydien-spezifischen Strukturen nachweisbar. Die Zellen wurden 48 h nach der Infektion fixiert.

### 3.2. Einfluss der Infektion auf die Matrixproteinsynthese

#### Epithelzellen

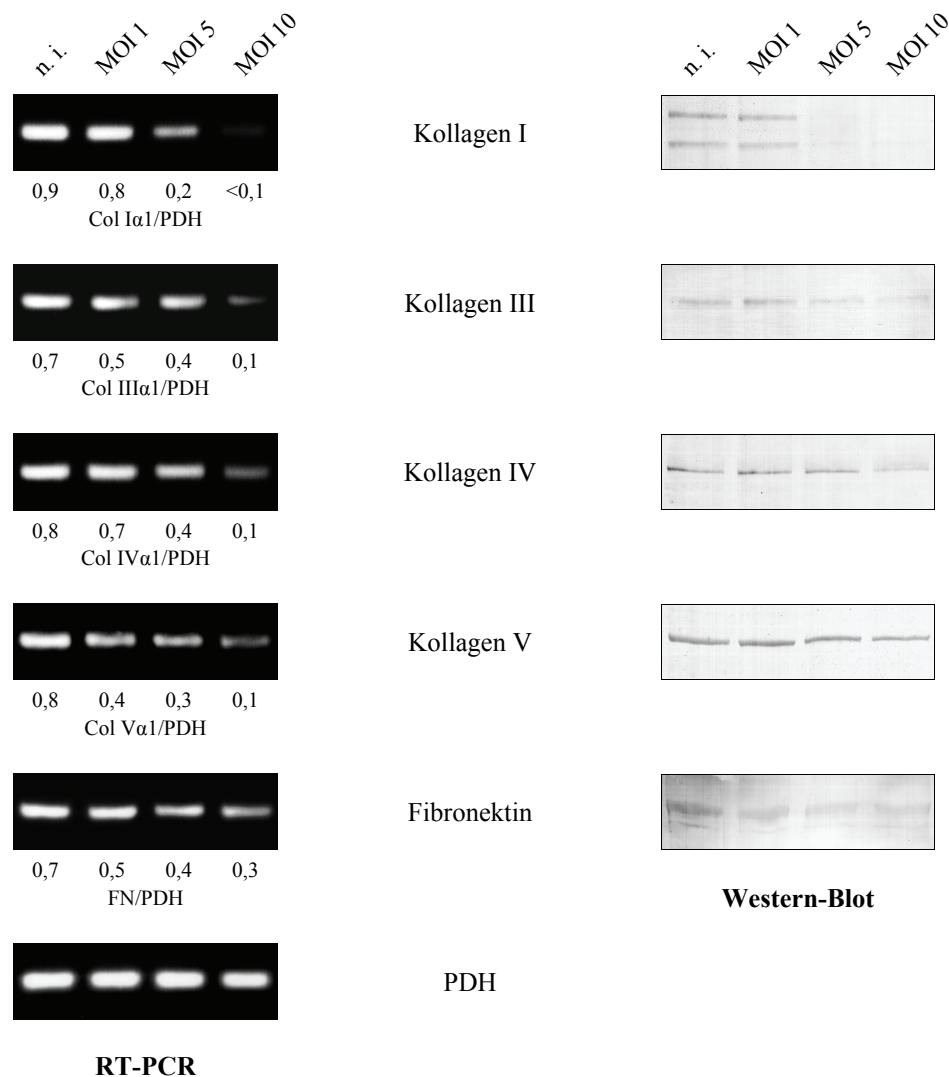
Primäre Epithelzellen synthetisierten nur das zum Aufbau der Basalmembran dienende Matrixprotein Kollagen IV sowie Kollagen V und Fibronectin. Die Kollagentypen IV und V wurden im Western-Blot als Einzelbanden von ca. 95 kDa detektiert; die Bande von Fibronectin war >200 kDa. Die interstitiellen Kollagene I und III wurden nicht exprimiert. Die Infektion mit verschiedenen Dosen von *C. pneumoniae* hatte keinen Einfluss auf die Produktion von Kollagen IV und Fibronectin; die Synthese von Kollagen V wurde leicht inhibiert (Abb. 4). Bei WISH-Zellen wurden die gleichen Ergebnisse erzielt (nicht gezeigt).



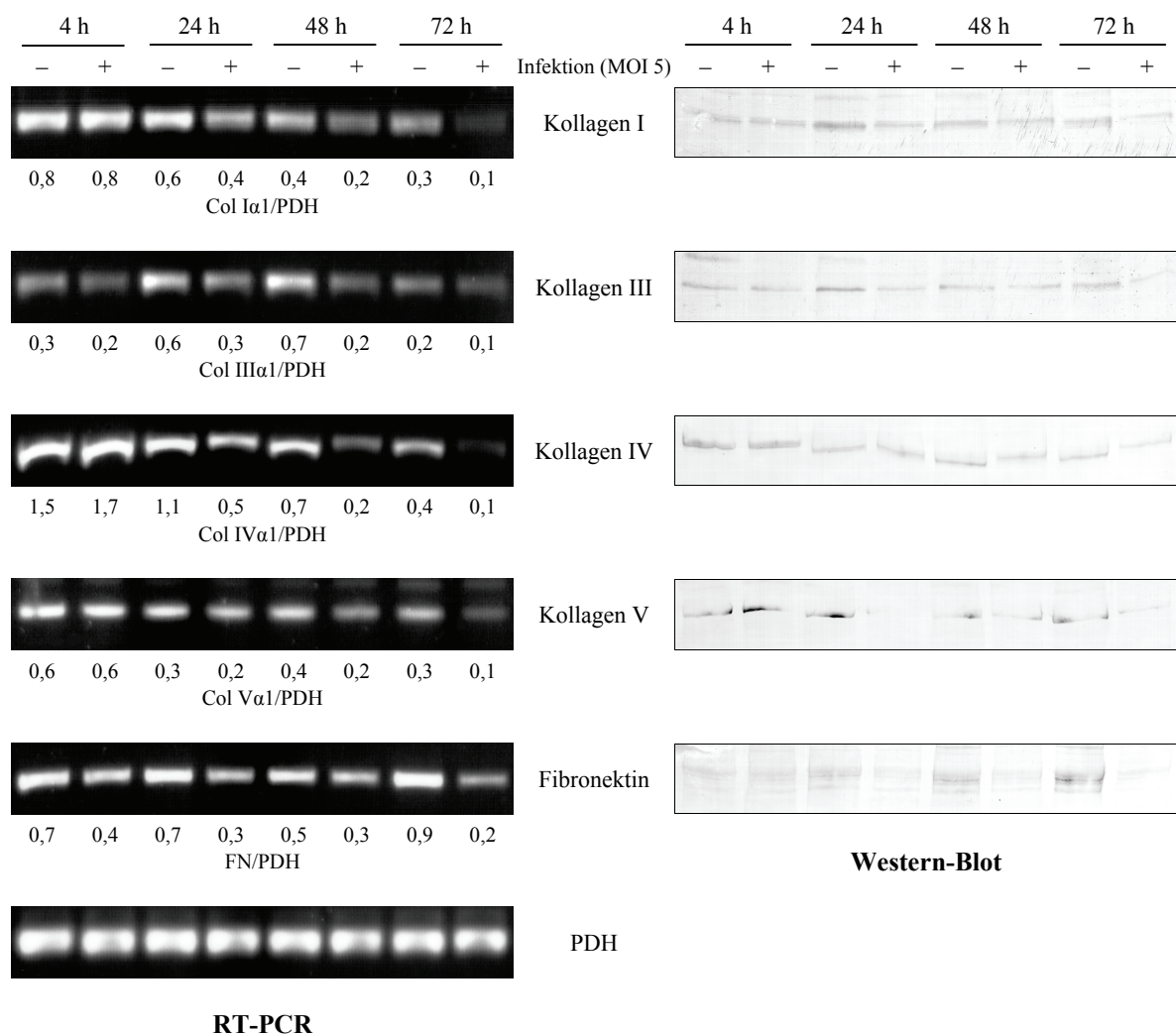
**Abb. 4:** Einfluss der Infektion mit verschiedenen Infektionsdosen von *C. pneumoniae* auf die mRNA- und Proteinsynthese extrazellulärer Matrixproteine bei primären Epithelzellen. Als Positivkontrolle dienten nicht infizierte Fibroblasten. Die Probenahme für die RT-PCR erfolgte 24 h nach der Infektion. Für den Protein-Nachweis wurden die Zellen 48 h nach der Infektion lysiert. n. i. - nicht infiziert, n. b. - nicht bestimmt.

## Glatte Muskelzellen

Bei bronchialen und vaskulären SMC führte die Infektion zur Inhibition aller untersuchten Matrixproteine auf mRNA- und Proteinebene in Abhängigkeit von der Infektionsdosis. Die niedrigste Infektionsdosis hatte nur geringe Auswirkungen, während deutliche Effekte ab MOI 5 feststellbar waren (*Abb. 5*). Die Expression der Kollagene I und III wurde am stärksten beeinflusst. Bei Kollagen I konnten, wie auch in fast allen folgenden Versuchen, im Western-Blot zwei Banden von etwa 80 kDa sowie 70 kDa nachgewiesen werden. Da der verwendete Antikörper nur die  $\alpha 1$ -Kette dieses Proteins detektiert (Stefanovic *et al.*, 2002), handelt es sich hierbei möglicherweise um das größere Vorläufermolekül sowie um die prozessierte kürzere Form.



**Abb. 5:** Einfluss der Infektion mit verschiedenen Infektionsdosen von *C. pneumoniae* auf die mRNA- und Proteinsynthese extrazellulärer Matrixproteine bei SMC. Die Probenahme für die RT-PCR erfolgte 24 h nach der Infektion. Für den Protein-Nachweis wurden die Zellen 48 h nach der Infektion lysiert.

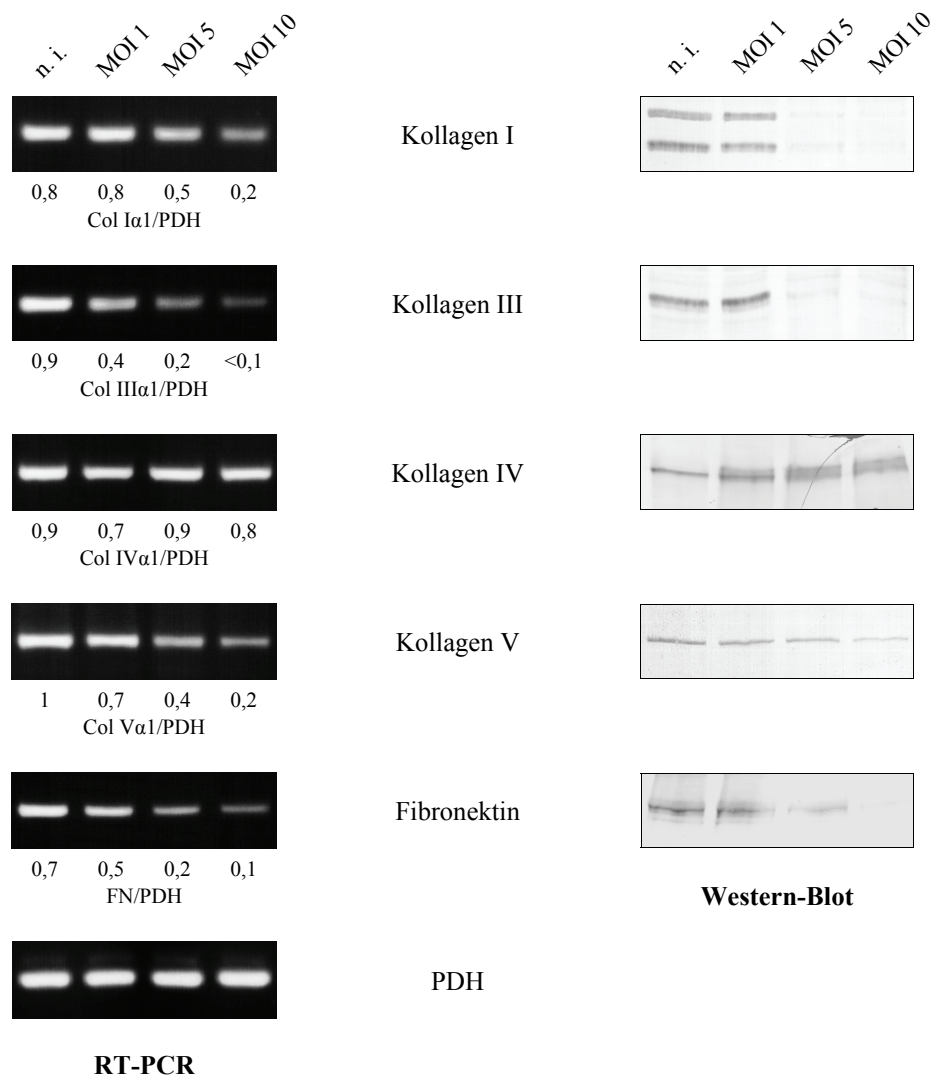


**Abb. 6:** Kollagen- und Fibronektinsynthese von *C. pneumoniae* -infizierten SMC bis 72 h nach Infektion. Die Probenahme für die RT-PCR sowie für den Western-Blot erfolgte nach den angegebenen Zeiträumen.

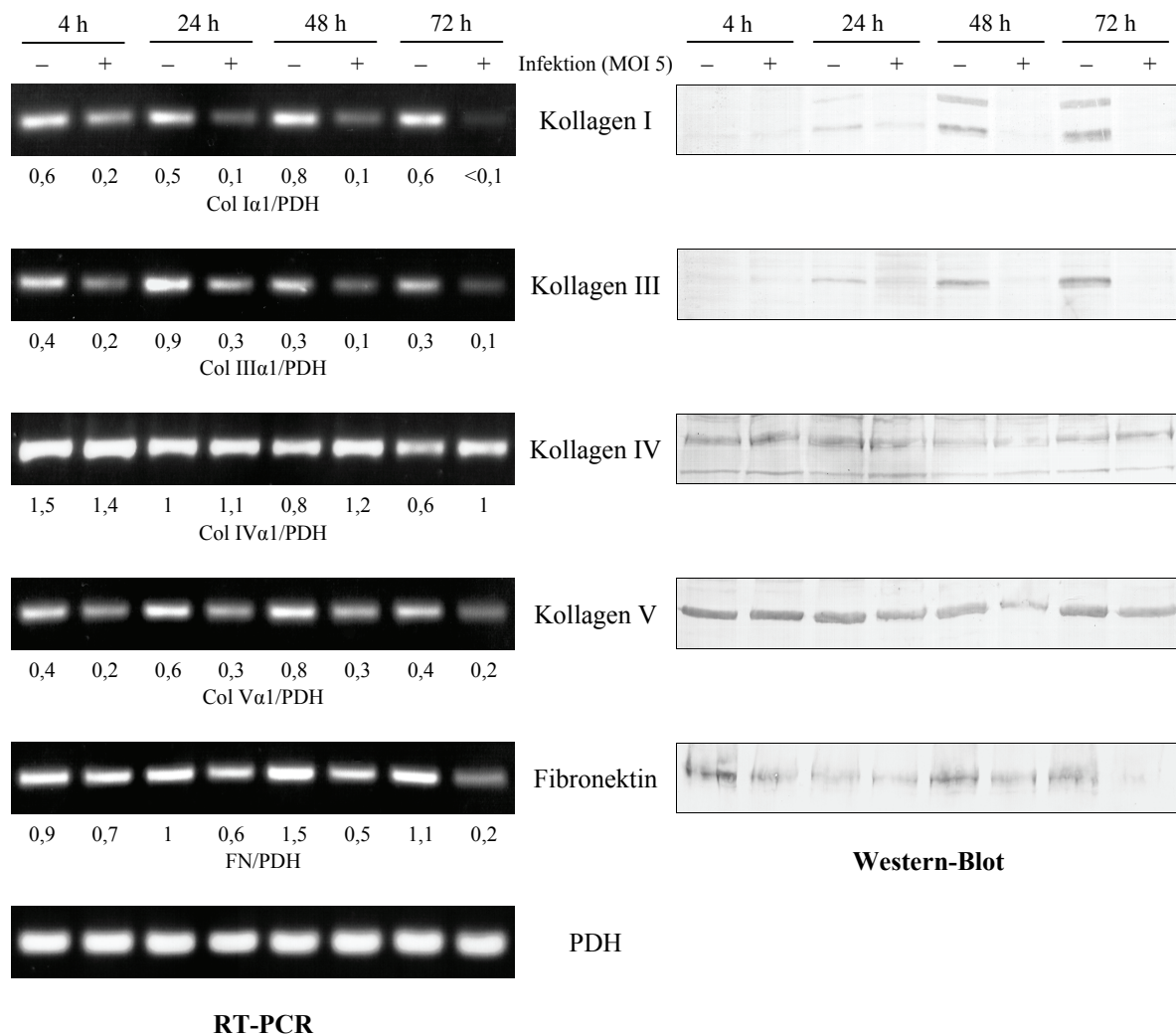
Im zeitlichen Verlauf konnte bereits nach 4 h eine verminderte Matrixproteinsynthese der infizierten Zellen festgestellt werden, wobei manchmal auch die nicht infizierten Kontrollzellen eine verringerte Expression aufwiesen (Abb. 6). Dies ist möglicherweise eine Folge der Zentrifugation beim Infektionsvorgang. Auch 72 h nach der Infektion war bei infizierten Zellen das mRNA-Niveau sowie die Proteinsynthese aller untersuchten Matrixproteine im Verhältnis zu den Kontrollzellen noch deutlich vermindert.

## Fibroblasten

Bei Fibroblasten konnten nach der Infektion prinzipiell die gleichen Effekte wie bei glatten Muskelzellen beobachtet werden. Mit steigender Infektionsdosis verringerten sich ebenfalls die Transkription und Translation der Kollagene I, III und V sowie von Fibronectin. Auch hier war ab MOI 5 eine deutliche Reduktion der Proteinsynthese feststellbar. Die Expression von Kollagen IV wurde aber im Gegensatz zu glatten Muskelzellen bei infizierten Zellen nicht beeinflusst. Im Western-Blot wurde durch die Infektion zwar eine Doppelbande induziert; die Gesamt-Proteinmenge veränderte sich jedoch kaum (Abb. 7).



**Abb. 7:** Einfluss der Infektion mit verschiedenen Infektionsdosen von *C. pneumoniae* auf die mRNA- und Proteinsynthese extrazellulärer Matrixproteine bei Fibroblasten. Die Probenahme für die RT-PCR erfolgte 24 h nach der Infektion. Für den Protein-Nachweis wurden die Zellen 48 h nach der Infektion lysiert.



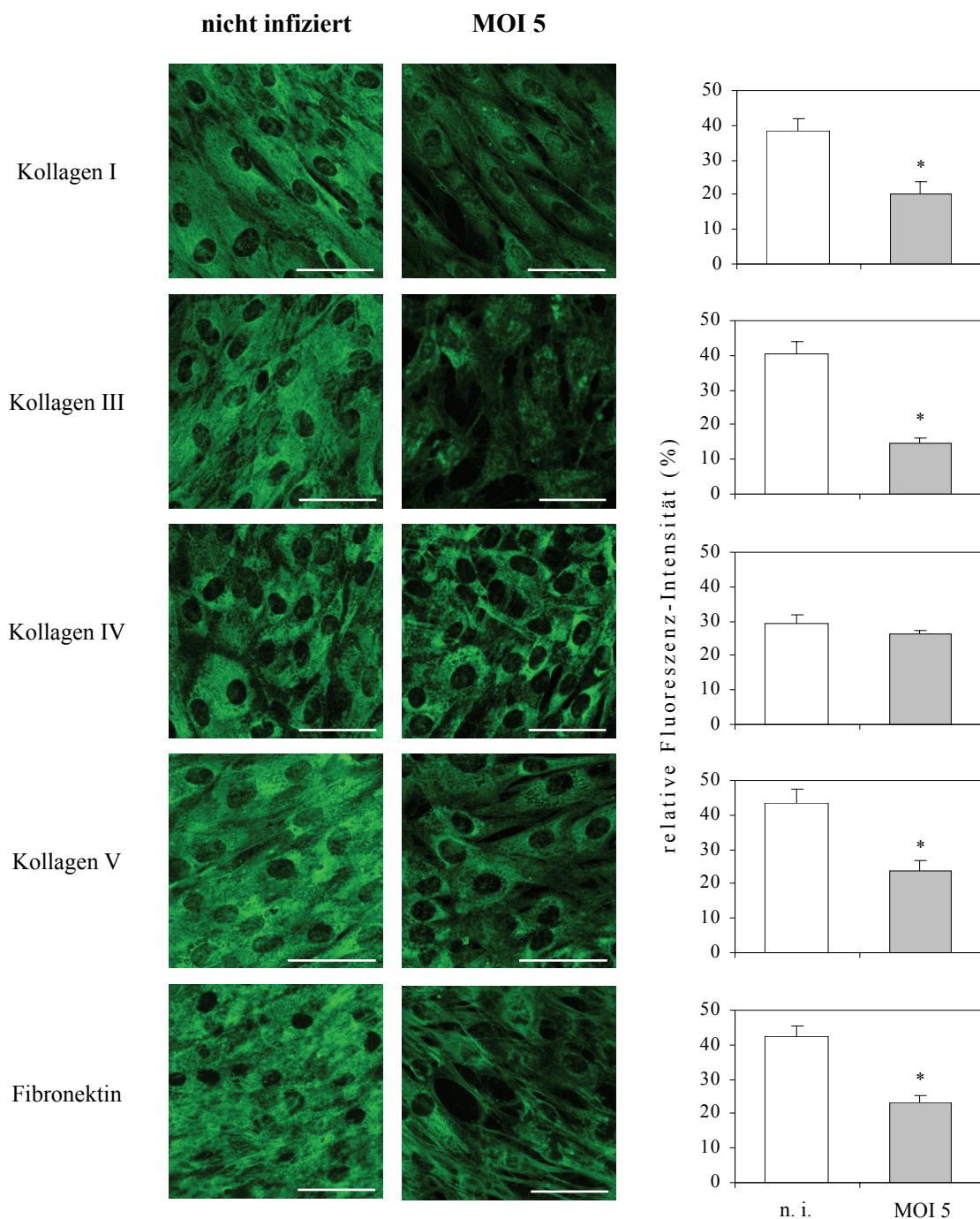
**Abb. 8:** Matrixproteinsynthese von *C. pneumoniae*-infizierten Fibroblasten bis 72 h nach Infektion. Die Probenahme für die RT-PCR sowie für den Western-Blot erfolgte nach den angegebenen Zeiträumen.

Im zeitlichen Verlauf der Matrixproteinsynthese ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei glatten Muskelzellen, allerdings wurde auch hier Kollagen IV durch die Infektion nicht beeinflusst (Abb. 8). Nach 4 h war das mRNA-Niveau bei infizierten Zellen schon deutlich erniedrigt und im Westernblot konnten zu diesem Zeitpunkt bei Kollagen I und III insgesamt nur geringe Proteinmengen nachgewiesen werden. Nach 72 h war die Expression der Kollagene I, III und V sowie von Fibronectin bei infizierten Kulturen immer noch inhibiert. Da die Regulation von extrazellulären Matrixproteinen, ausgenommen Kollagen IV, bei infizierten SMC und Fibroblasten prinzipiell gleich war, wurden die weiteren Versuche nur noch mit Fibroblasten als Vertreter mesenchymaler Zellen durchgeführt.



### Immunfluoreszenzfärbung extrazellulärer Matrixproteine bei Fibroblasten

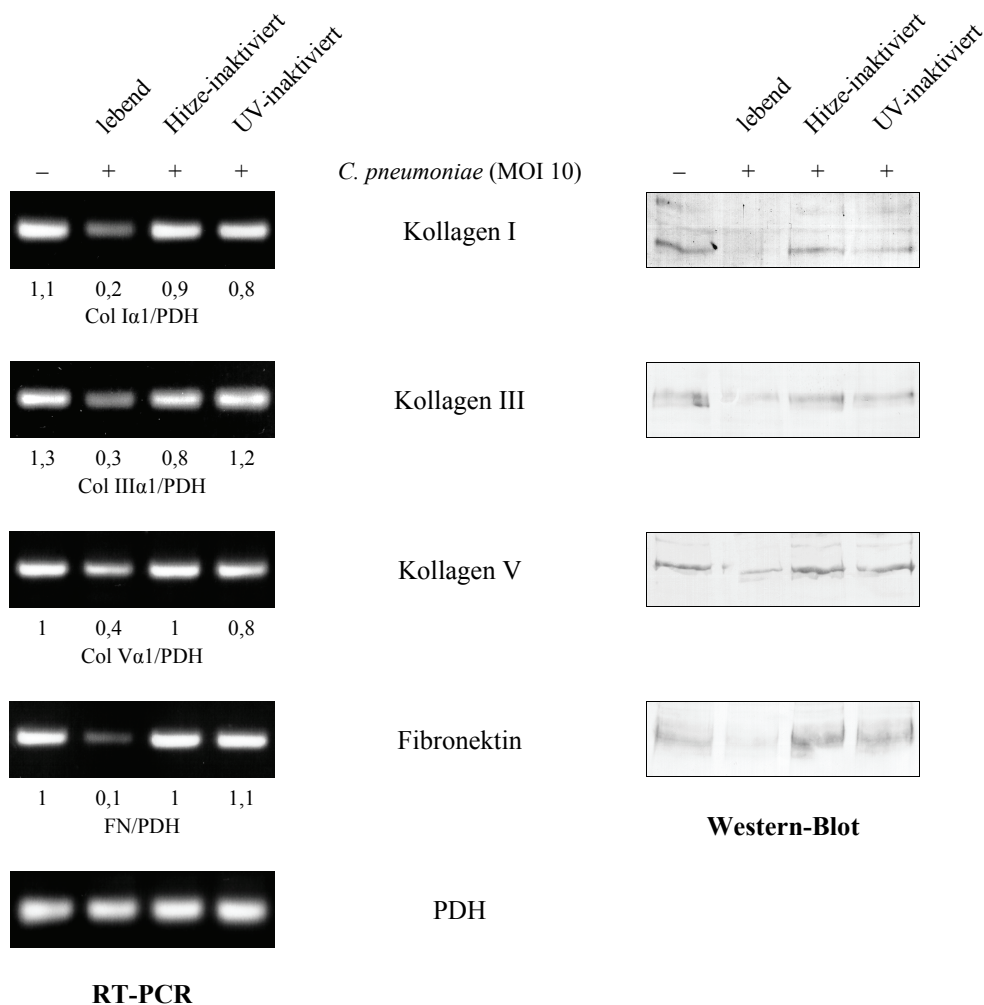
In fixierten Präparaten von kultivierten Fibroblasten konnten mittels Immunfluoreszenz alle untersuchten Matrixproteine nachgewiesen werden (*Abb. 9*). Bei infizierten Zellen war die mittlere relative Intensität des Fluoreszenzsignals für Kollagen I, III, V und Fibronectin im Vergleich zu nicht infizierten Zellen um etwa die Hälfte verringert. Bei Kollagen IV ließ sich kein Unterschied zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen feststellen.



**Abb. 9:** Immunfluoreszenznachweis der untersuchten extrazellulären Matrixproteine bei nicht infizierten und infizierten Fibroblasten sowie mittlere relative Fluoreszenz-Intensitäten der in vier Quadranten unterteilten Aufnahmen. Die Zellen wurden 48 h nach der Infektion fixiert. Weißer Balken = 50  $\mu$ m. \*  $p \leq 0,001$  (Student t-Test;  $n = 4$ ).

### Chlamydieninaktivierung durch Hitze oder UV-Licht

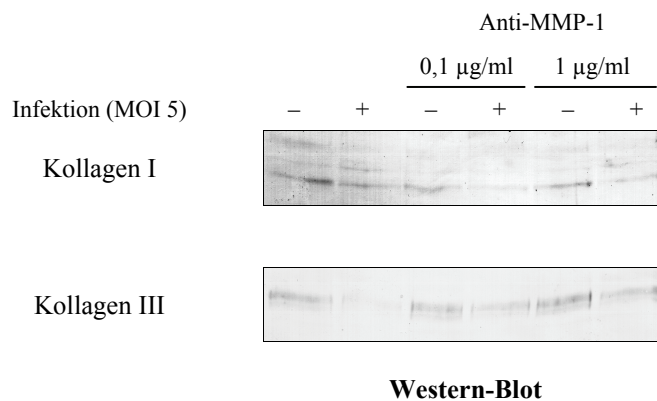
Hitze (75 °C) oder UV-Behandlung führt nach kurzer Zeit zur Abtötung von Mikroorganismen. Hitzeeinwirkung bewirkt die Denaturierung aller Proteine; LPS wird hierdurch in seiner Struktur jedoch nicht verändert. Auf diese Weise inaktivierte Chlamydien hatten keinen Einfluss mehr auf die Matrixproteinsynthese. Auch die UV-Exposition führte zum Verlust der regulatorischen Fähigkeiten (*Abb. 10*).



**Abb. 10:** Wirkung der Hitze- und UV-Inaktivierung von *C. pneumoniae* auf die mRNA- und Proteinsynthese extrazellulärer Matrixproteine bei Fibroblasten. Die Zellen wurden mit jeweils  $10^7$  IFU/well (MOI 10) zentrifugiert. Die Probenahme für die RT-PCR erfolgte 24 h nach der Infektion. Für den Protein-Nachweis wurden die Zellen 48 h nach der Infektion lysiert.

### Neutralisation von MMP-1 im Kulturüberstand infizierter Fibroblasten

Die Neutralisation der Matrixprotein-abbauenden Endoprotease MMP-1 im Kulturüberstand von Fibroblasten mit Hilfe spezifischer Antikörper hatte keinen Einfluss auf den verminderten Nachweis von extrazellulären Matrixproteinen bei infizierten Zellen, wie beispielhaft für Kollagen I und III gezeigt wurde (*Abb. 11*).



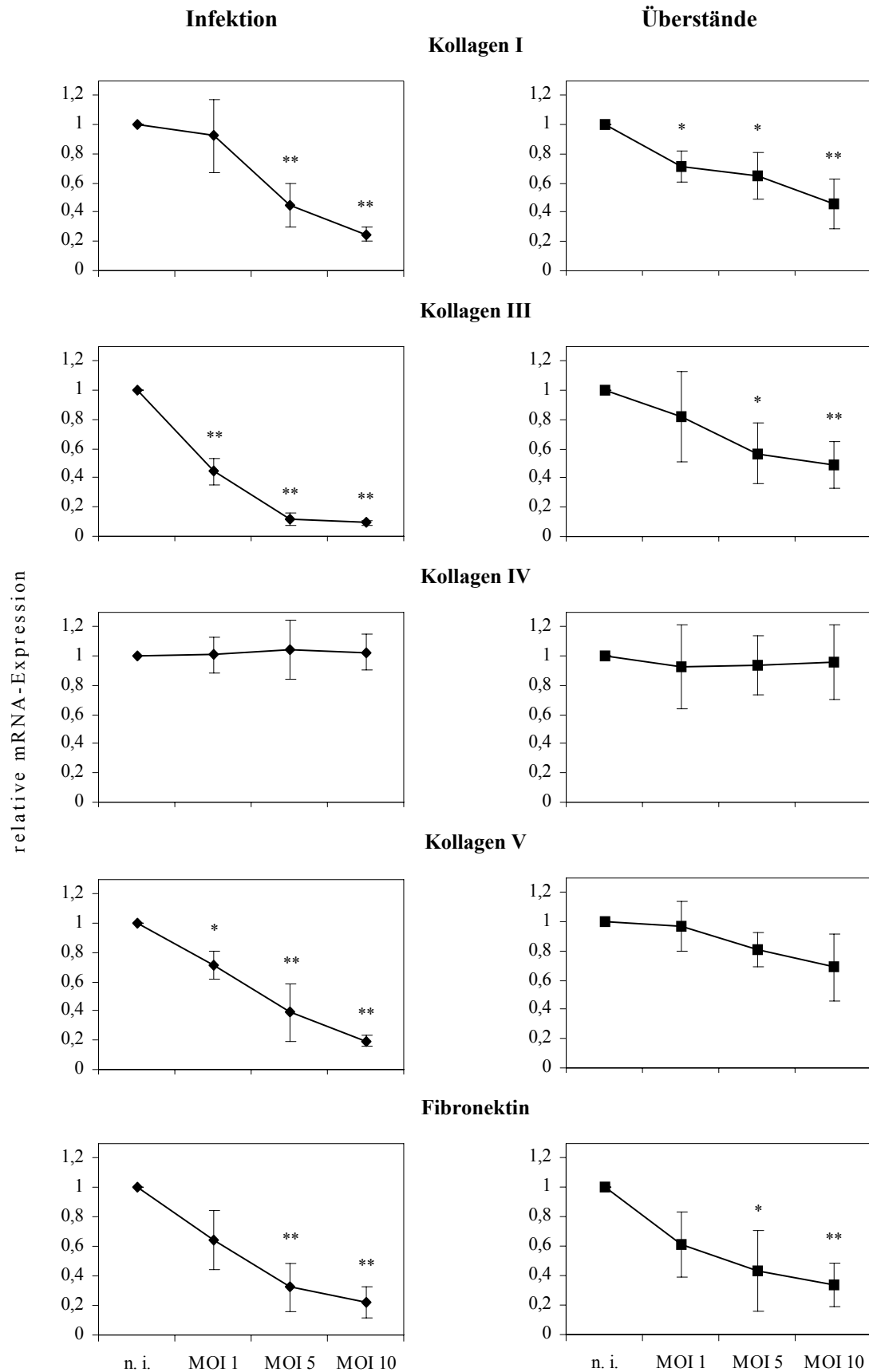
**Abb. 11:** Proteinnachweis der interstitiellen Kollagene I und III im Lysat von Fibroblasten nach Infektion und Neutralisation der interstitiellen Kollagenase MMP-1 im Kulturüberstand mit spezifischen Antikörpern. Die Zellen wurden 48 h nach der Infektion lysiert.

### 3.3. Beeinflussung der Matrixproteinsynthese durch lösliche Mediatoren

#### Einfluss der Überstände infizierter Fibroblasten auf nicht infizierte Fibroblasten

Auch die Überstände von infizierten Fibroblasten beeinflussten die mRNA-Synthese der untersuchten Matrixproteine bei nicht infizierten Zellen. In *Abb. 12* erfolgte die Darstellung der relativen mRNA-Expression im Verhältnis zu Kontrollzellen, die mit Medium von nicht infizierten Zellen inkubiert wurden. Die einzelnen Datenpunkte sind Mittelwerte von vier unabhängigen Versuchen. Zum Vergleich sind an dieser Stelle die Effekte bei infizierten Zellkulturen noch einmal in entsprechender Weise gegenübergestellt worden.

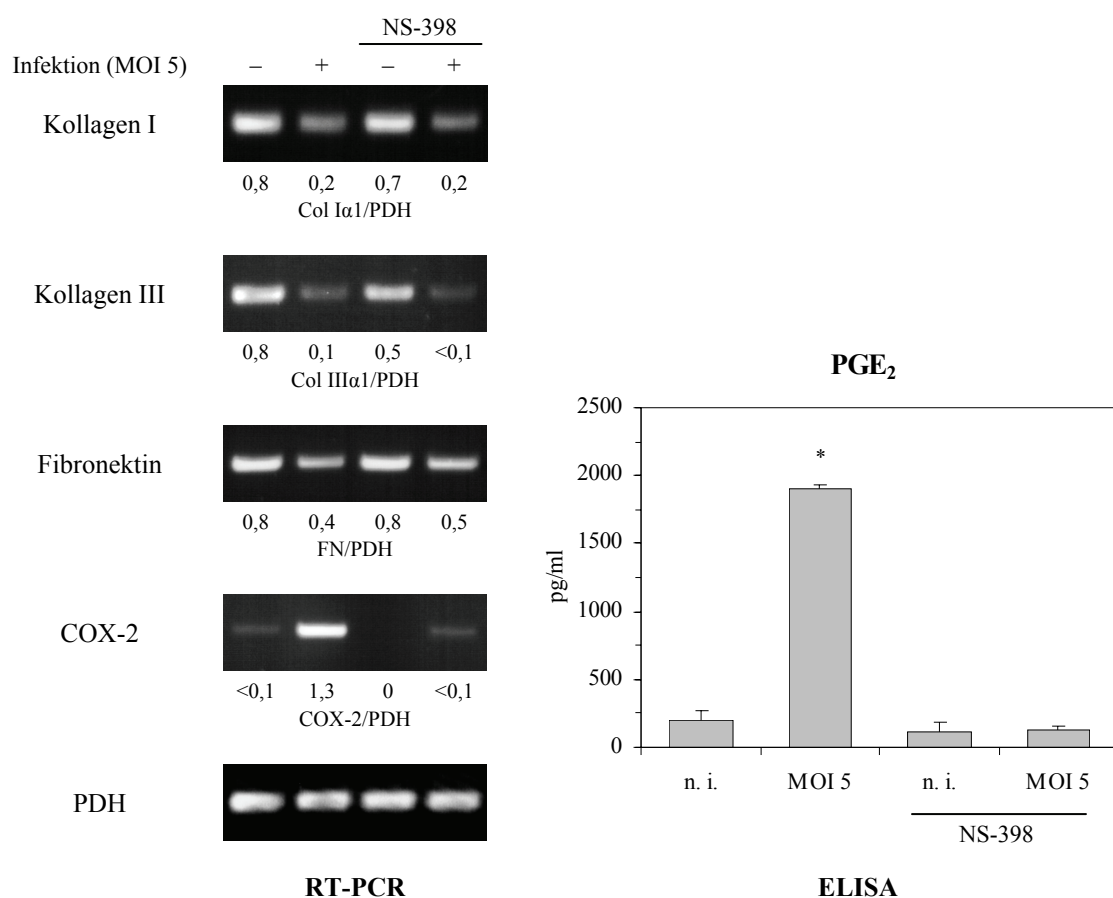
Kollagen I und III sowie Fibronectin wurden durch das konditionierte Medium in ähnlichem Maße wie bei infizierten Zellen inhibiert. Die Expression von Kollagen IV blieb aber auch hier unverändert. Die Transkription von Kollagen V nahm ebenfalls ab; der Unterschied zur Kontrolle war im Gegensatz zu infizierten Zellen allerdings nicht signifikant. Für die Identifizierung der verantwortlichen löslichen Mediatoren wurde bei den folgenden Experimenten nur die Expression von Kollagen I, III und Fibronectin untersucht.



**Abb. 12:** Einfluss der Infektion sowie von Überständen *C. pneumoniae*-infizierter Fibroblasten auf die relative mRNA-Expression extrazellulärer Matrixproteine bei Fibroblasten. Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Infektion oder der Inkubation mit konditioniertem Medium. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu nicht infizierten Zellen bzw. zu Überständen nicht infizierter Zellen (1-Stichproben t-Test;  $n = 4$ ).

### Inhibition der PGE<sub>2</sub>-Synthese bei infizierten Fibroblasten

Chlamydien stimulieren ihre Wirtszellen zur Synthese von PGE<sub>2</sub> (Rödel *et al.*, 2004). Dieses kann die Kollagen-Expression inhibieren (Riquet *et al.*, 2000). Durch die Hemmung des Schlüsselenzyms COX-2 wurde bei infizierten Zellen die Bildung von PGE<sub>2</sub> verhindert. Außerdem kam es zur Inhibition der COX-2-Transkription, die bei Fibroblasten über Prostaglandin-Metabolite stimuliert wird (Vichai *et al.*, 2005). Ein Einfluss auf die mRNA-Synthese der untersuchten Matrixproteine konnte nicht festgestellt werden (Abb. 13).

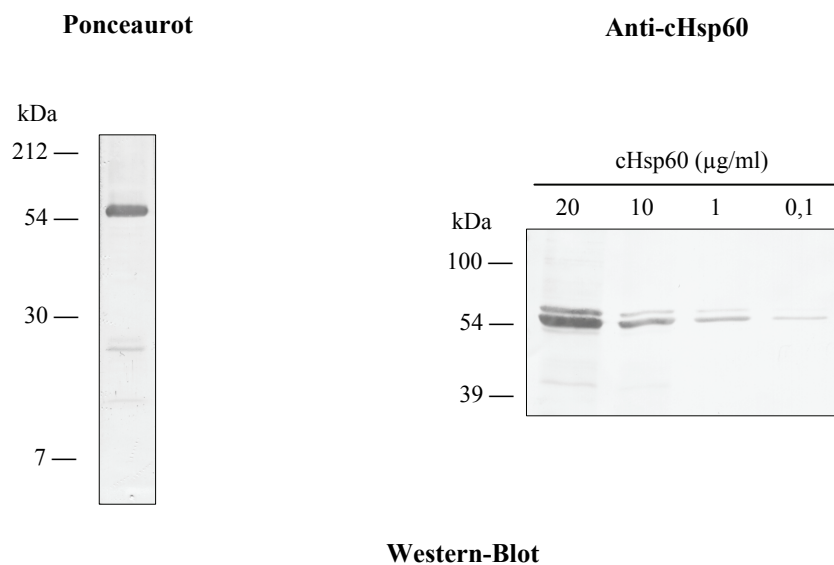


**Abb. 13:** Inhibition des Schlüsselenzyms COX-2 durch den selektiven Inhibitor NS-398: Auswirkung auf die mRNA-Expression von extrazellulären Matrixproteinen und von COX-2 sowie Nachweis von PGE<sub>2</sub> in den Kulturüberständen von Fibroblasten. Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Infektion. \*  $p \leq 0,001$  im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Student t-Test;  $n = 4$ ).

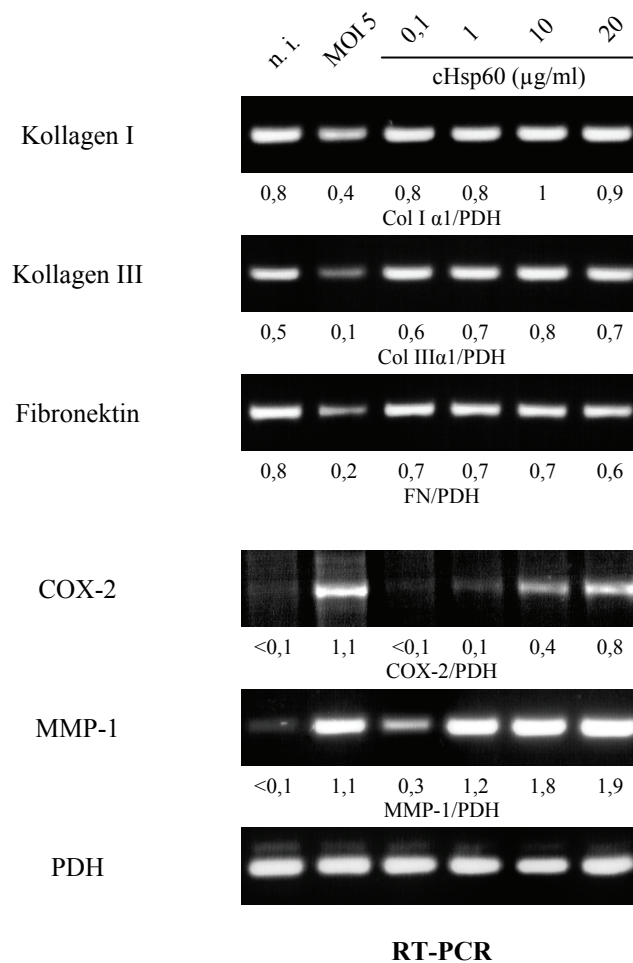
### Der Einfluss von chlamydialem Hsp60 auf die Matrixproteinsynthese

Hsp60 wird von Chlamydien in großen Mengen im Laufe der Vermehrung gebildet und in das Zytoplasma der Wirtszelle sowie in den Extrazellularraum abgegeben (Costa *et al.*, 2002). Dieses Stressprotein ist an der Regulation von inflammatorischen Genen beteiligt und kann verschiedene Signalzellwege aktivieren.

Nach der Aufreinigung konnte das von *E. coli* produzierte rekombinante chlamydiale Hsp60 im Western-Blot durch unspezifische Proteinfärbung (Ponceaurot) als einzelne Bande von 60 kDa detektiert werden. Mit einem spezifischen Antikörper wurde cHsp60 auch in allen für die Versuche verwendeten Proteinverdünnungen nachgewiesen (Abb. 14). Die getesteten Konzentrationen hatten bei Fibroblasten keinen Einfluss auf die mRNA-Synthese der untersuchten Matrixproteine. Als Positivkontrollen dienten COX-2 und MMP-1, deren Transkription sowohl durch die Infektion als auch durch cHsp60 induziert wurde (Abb. 15).



**Abb. 14:** Nachweis von rekombinantem cHsp60 (His-tag-Fusionsprotein) nach Ni-NTA-Aufreinigung: Ponceaurot-Färbung eines Proteins der entsprechenden Größe nach Gelelektrophorese und Detektion von cHsp60 in dem für die Versuche verwendeten Konzentrationsbereich.



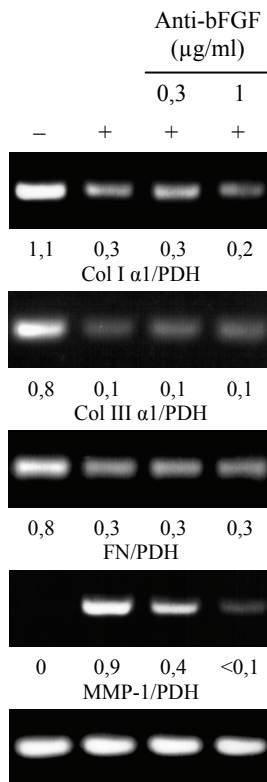
**Abb. 15:** Wirkung von rekombinantem chlamydialem Hsp60 auf die Transkription extrazellulärer Matrixproteine sowie auf die Kontrollgene MMP-1 und COX-2 bei Fibroblasten. Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Infektion bzw. der Stimulation mit cHsp60.

### Neutralisation löslicher Mediatoren im Kulturüberstand von Fibroblasten

*C. pneumoniae* induziert bei Mesenchymzellen die Zytokine IL-8, GRO- $\alpha$ , bFGF und IFN- $\beta$  (Rödel *et al.*, 2000; Rödel *et al.*, 2001; Rödel *et al.*, 2007; Selzman *et al.*, 2003), die auch die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen inhibieren können (Pickering *et al.*, 1997; Tanabe *et al.*, 2007; Unemori *et al.*, 1993). Diese löslichen Mediatoren wurden in den Überständen von infizierten Fibroblasten mit spezifischen Antikörpern neutralisiert. Die Wirksamkeit der verwendeten Antikörper wurde am Beispiel von bFGF und IFN- $\beta$  durch die Hemmung der mRNA-Synthese der Enzyme MMP-1 bzw. IDO gezeigt (Positivkontrollen), welche maßgeblich über diese Faktoren induziert werden (Rödel *et al.*, 2001; Yasui *et al.*, 2004). Die Neutralisation der Zytokine IL-8, GRO- $\alpha$  sowie bFGF hatte keinen Effekt auf die inhibierte Transkription der untersuchten Matrixproteine bei infizierten Zellen. Bei der Neutralisation von IFN- $\beta$  konnte jedoch wieder ein Anstieg des mRNA-Niveaus festgestellt werden (Abb. 16).



### bFGF-Neutralisation



Infektion (MOI 5)

Kollagen I

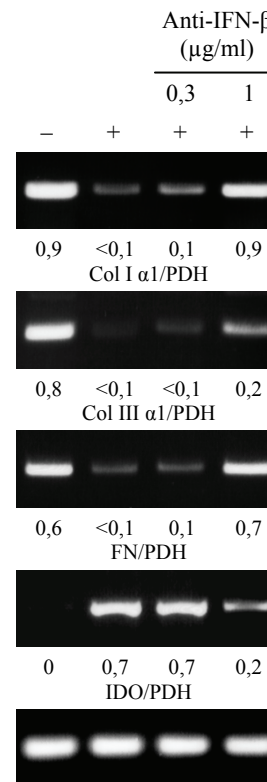
Kollagen III

Fibronectin

MMP-1 Kontrolle

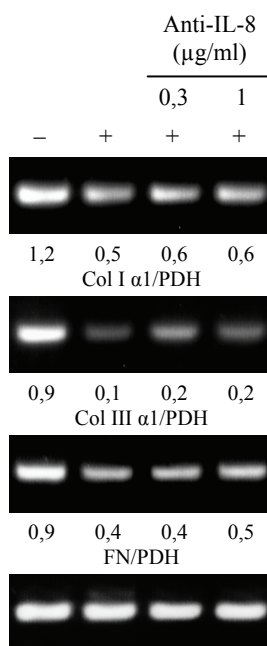
PDH

### IFN- $\beta$ -Neutralisation



IDO

### IL-8-Neutralisation



Infektion (MOI 5)

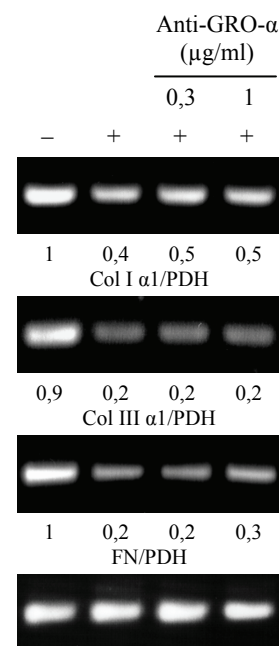
Kollagen I

Kollagen III

Fibronectin

PDH

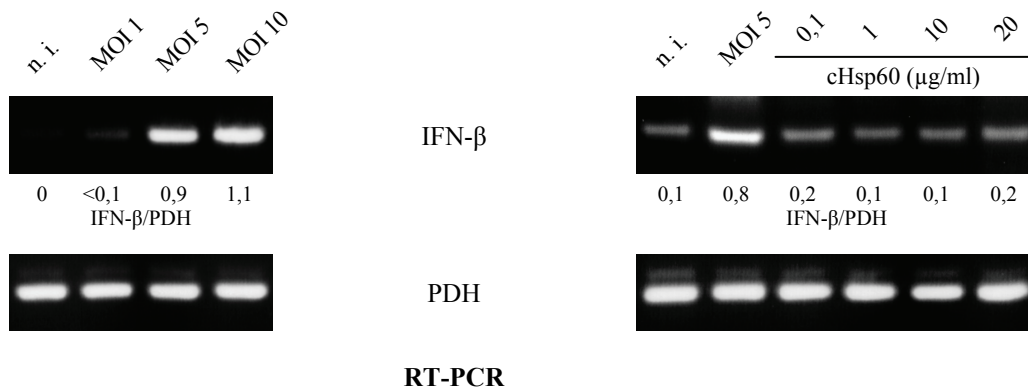
### GRO- $\alpha$ -Neutralisation



RT-PCR

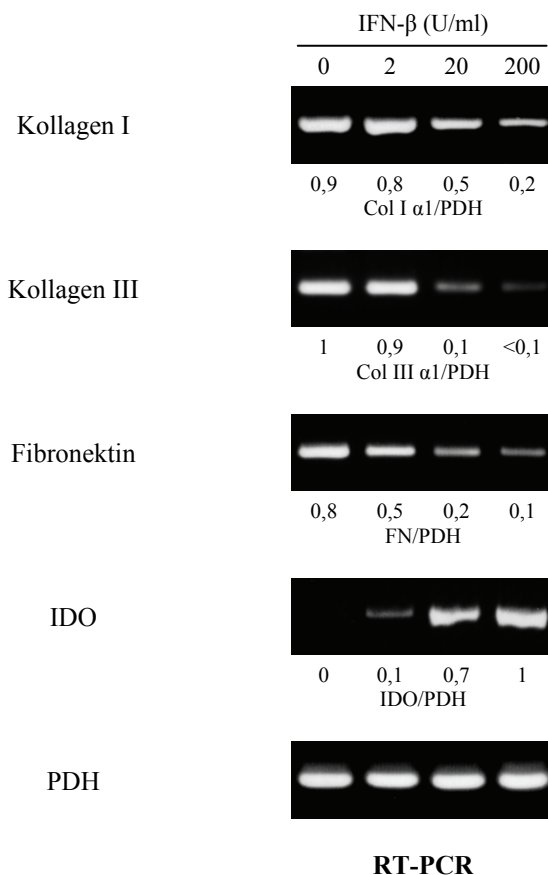
**Abb. 16:** Auswirkung der Neutralisation von bFGF, IFN- $\beta$ , IL-8 und GRO- $\alpha$  im Kulturüberstand auf die Transkription extrazellulärer Matrixproteine bei infizierten Fibroblasten. Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Infektion.





**Abb. 17:** Einfluss der Infektion mit *C. pneumoniae* sowie von rekombinantem chlamydialem Hsp60 auf die Induktion der mRNA-Synthese von IFN-β bei Fibroblasten. Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Infektion bzw. der Stimulation mit cHsp60.

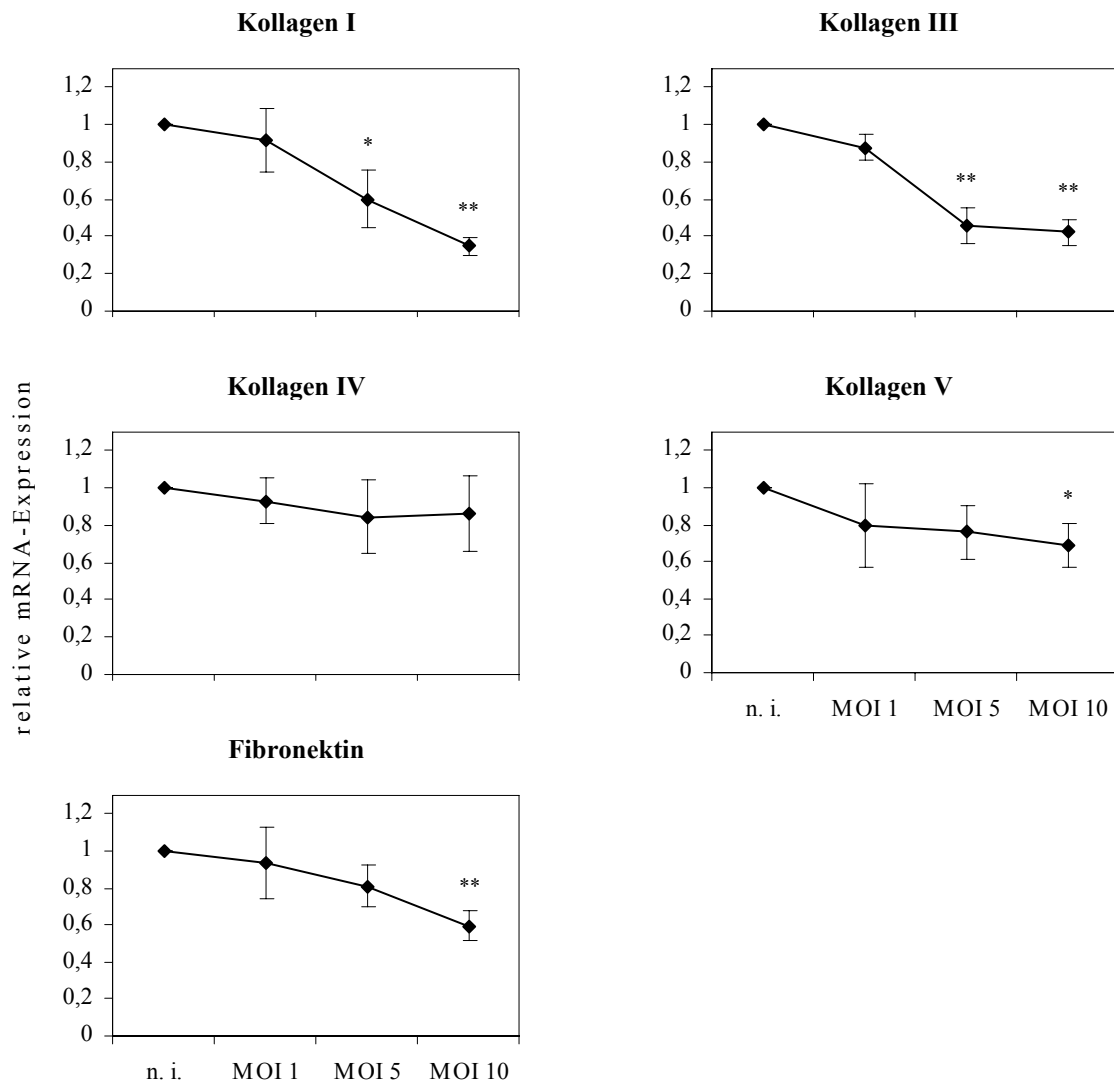
Die Transkription von IFN-β wurde bei Fibroblasten durch die Infektion, aber nicht durch die Inkubation mit cHsp60 induziert (Abb. 17). Weiterhin wurden nicht infizierte Zellen mit rekombinantem IFN-β stimuliert. Dieses bewirkte in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration eine zunehmende Inhibition der mRNA-Synthese der untersuchten Matrixproteine und induzierte die Transkription der Positivkontrolle IDO (Abb. 18).



**Abb. 18:** Inhibition der mRNA-Synthese extrazellulärer Matrixproteine und Induktion der Transkription des Kontrollgens IDO bei nicht infizierten Fibroblasten 24 h nach der Stimulation mit IFN-β.

### Einfluss der Überstände infizierter Epithelzellen auf Fibroblasten

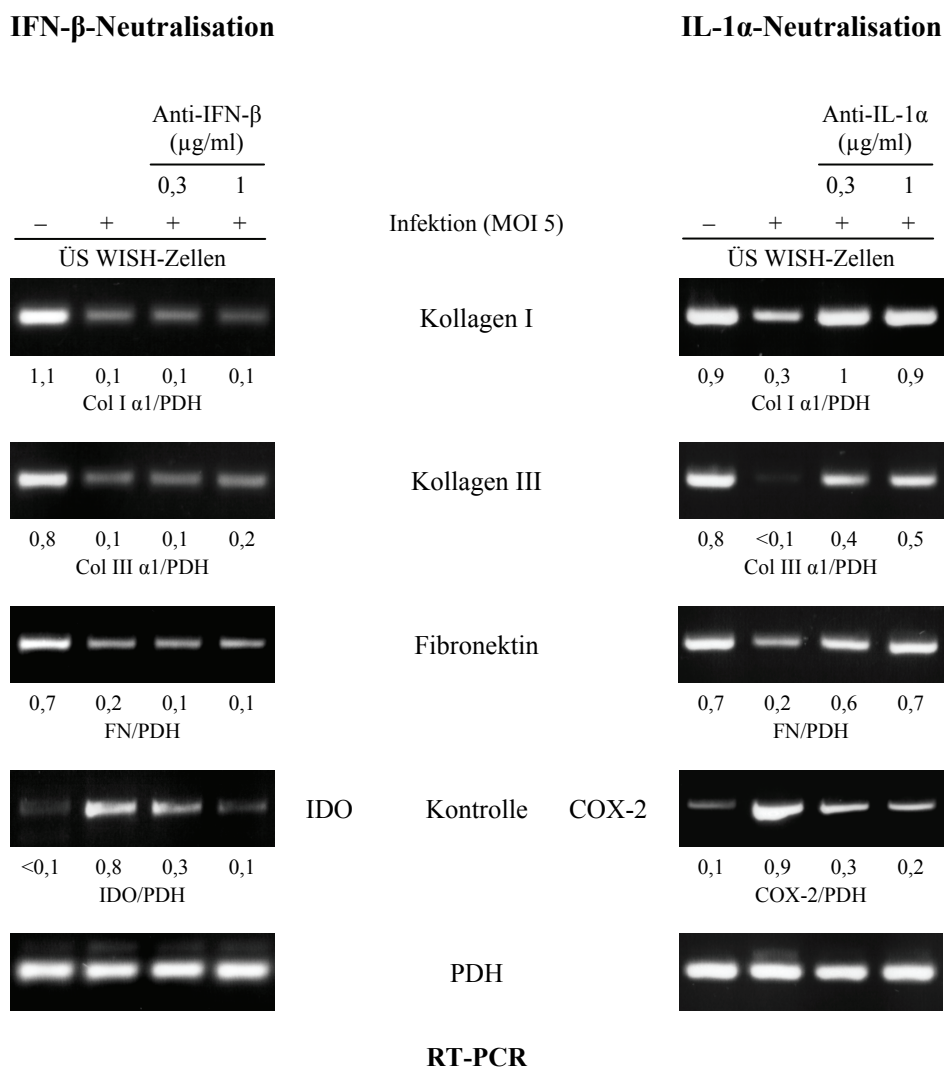
Die Überstände von infizierten WISH-Zellen bewirkten ab MOI 5 bei nicht infizierten Fibroblasten ebenfalls eine starke Inhibition der mRNA-Synthese der Kollagene I und III. Die Transkription von Kollagen V sowie von Fibronectin verringerte sich dagegen nur geringfügig. Nach Inkubation der Zellen mit den Überständen der höchsten Infektionsdosis konnte dennoch eine signifikante Abnahme der Transkription dieser beiden Matrixproteine festgestellt werden. Die Expression von Kollagen IV wurde nicht beeinflusst (Abb. 19). Zur Untersuchung der potentiellen löslichen Mediatoren wurde auch hier im Folgenden nur die Expression von Kollagen I, III und Fibronectin betrachtet.



**Abb. 19:** Beeinflussung der mRNA-Synthese extrazellulärer Matrixproteine bei nicht infizierten Fibroblasten durch Überstände von *C. pneumoniae*-infizierten WISH-Zellen. Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Inkubation mit konditioniertem Medium. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu Überständen von nicht infizierten Zellen (1-Stichproben t-Test;  $n = 4$ ).

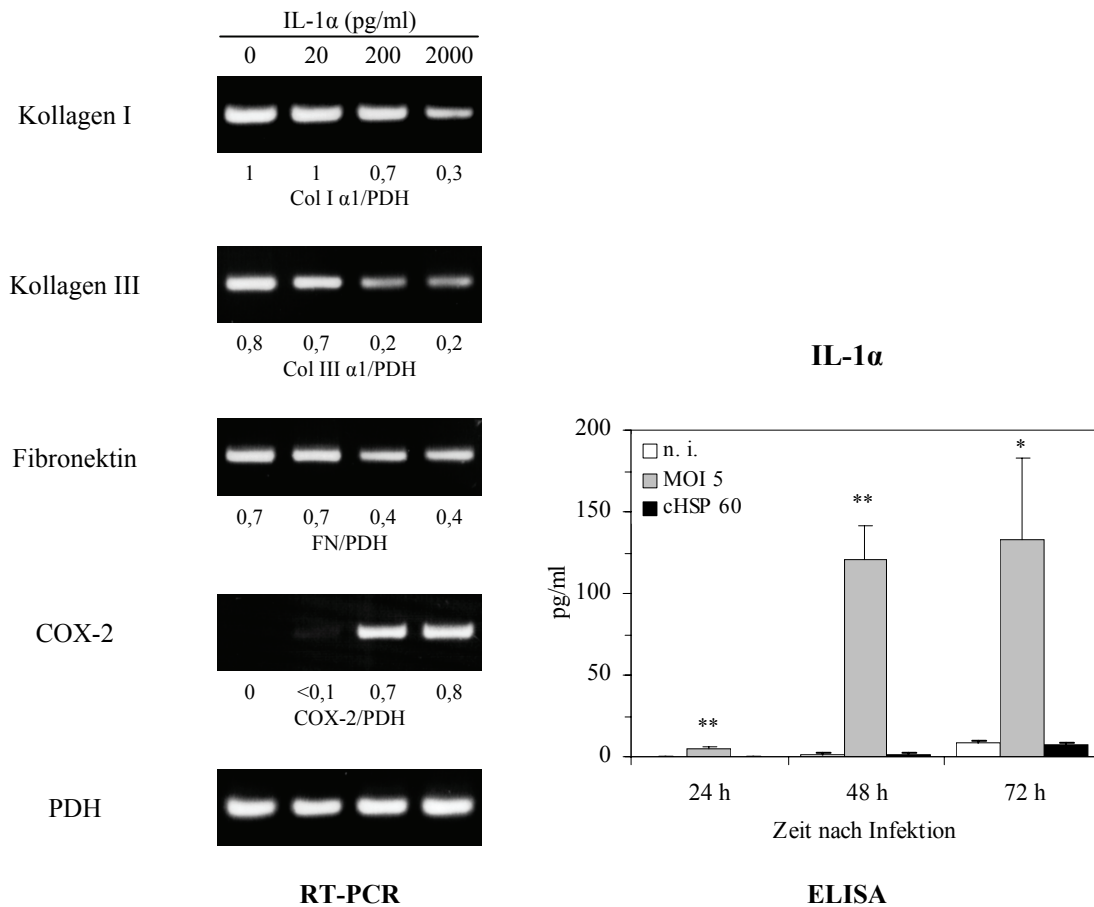
### Neutralisation löslicher Mediatoren im Kulturüberstand von Epithelzellen

Epithelzellen können nach der Infektion mit Chlamydien ebenfalls IFN- $\beta$  bilden (Lad *et al.*, 2005). Die bei Fibroblasten durch Überstände von infizierten WISH-Zellen induzierte Expression des Enzyms IDO nahm durch die Neutralisation dieses Zytokins zwar ab; im Gegensatz zu infizierten Zellen wurde die Inhibition der mRNA-Synthese von Kollagen I, III und Fibronectin aber nicht beeinflusst (Abb. 20). Die Neutralisation der Zytokine IL-8, GRO- $\alpha$  und bFGF sowie die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch den COX-2-Inhibitor NS-398 hatte ebenfalls keine Auswirkungen (nicht dargestellt).



### RT-PCR

**Abb. 20:** Auswirkung der Inkubation nicht infizierter Fibroblasten mit Kulturüberständen von infizierten WISH-Zellen auf die Transkription extrazellulärer Matrixproteine nach der Neutralisation von IFN- $\beta$  oder IL-1 $\alpha$ . Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Inkubation mit konditioniertem Medium.



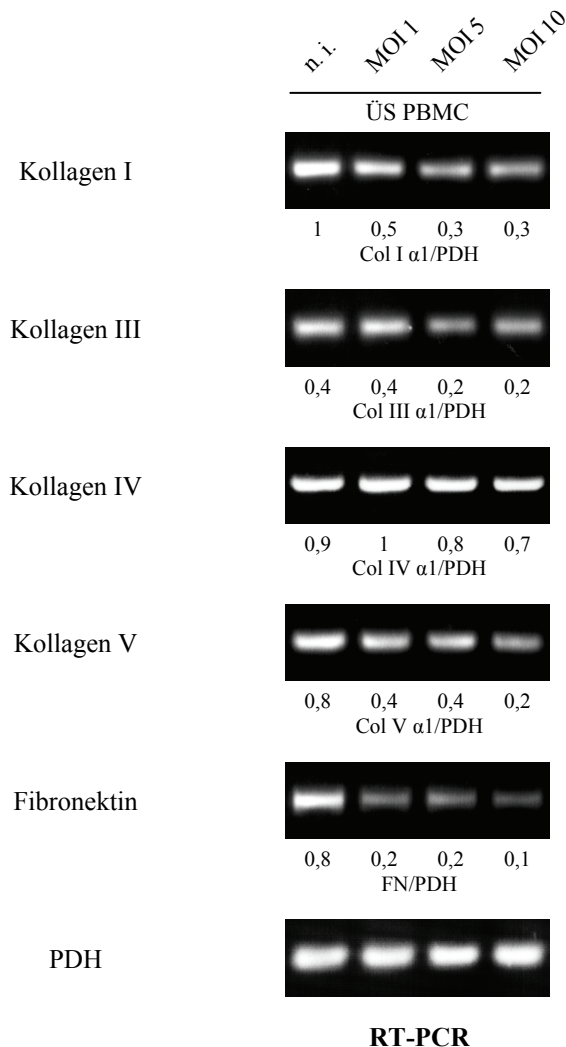
**Abb. 21:** Inhibition der Transkription extrazellulärer Matrixproteine bei Fibroblasten durch rekombinantes IL-1 $\alpha$  und Nachweis dieses Zytokins in den Überständen von infizierten sowie mit cHsp60 stimulierten WISH-Zellen. Die Probenahme erfolgte 24 h nach Versuchsbeginn bzw. nach den angegebenen Zeiträumen. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Student t-Test;  $n = 4$ ).

Infizierte Epithelzellen produzieren das Zytokin IL-1 $\alpha$  (Rasmussen *et al.*, 1997), das auch zur Inhibition der Kollagenproduktion beitragen kann (Curfs *et al.*, 1997). Die Inkubation von WISH-Überständen mit Antikörpern gegen IL-1 $\alpha$  führte wieder zu einem Anstieg des mRNA-Niveaus der untersuchten Matrixproteine (Abb. 20). Die Spezifität des Effektes wurde durch eine verringerte Induktion der Positivkontrolle COX-2 bestätigt, die bei verschiedenen Zelltypen über dieses Zytokin vermittelt wird (Dinarello, 1996; Mifflin *et al.*, 2002). Darüber hinaus ließ sich IL-1 $\alpha$  mittels ELISA in den Überständen von infizierten WISH-Zellen nachweisen; im Gegensatz dazu induzierte chlamydiales Hsp60 die Synthese dieses Zytokins nicht. In Überständen von infizierten Fibroblasten konnte IL-1 $\alpha$  nicht detektiert werden. Die Isoform IL-1 $\beta$  wurde weder von infizierten WISH-Zellen noch von Fibroblasten produziert. Die Stimulation von Fibroblasten mit rekombinantem IL-1 $\alpha$  führte zur Inhibition der Kollagen- und Fibronectin-Transkription sowie zur Aktivierung der Transkription von COX-2 (Abb. 21).

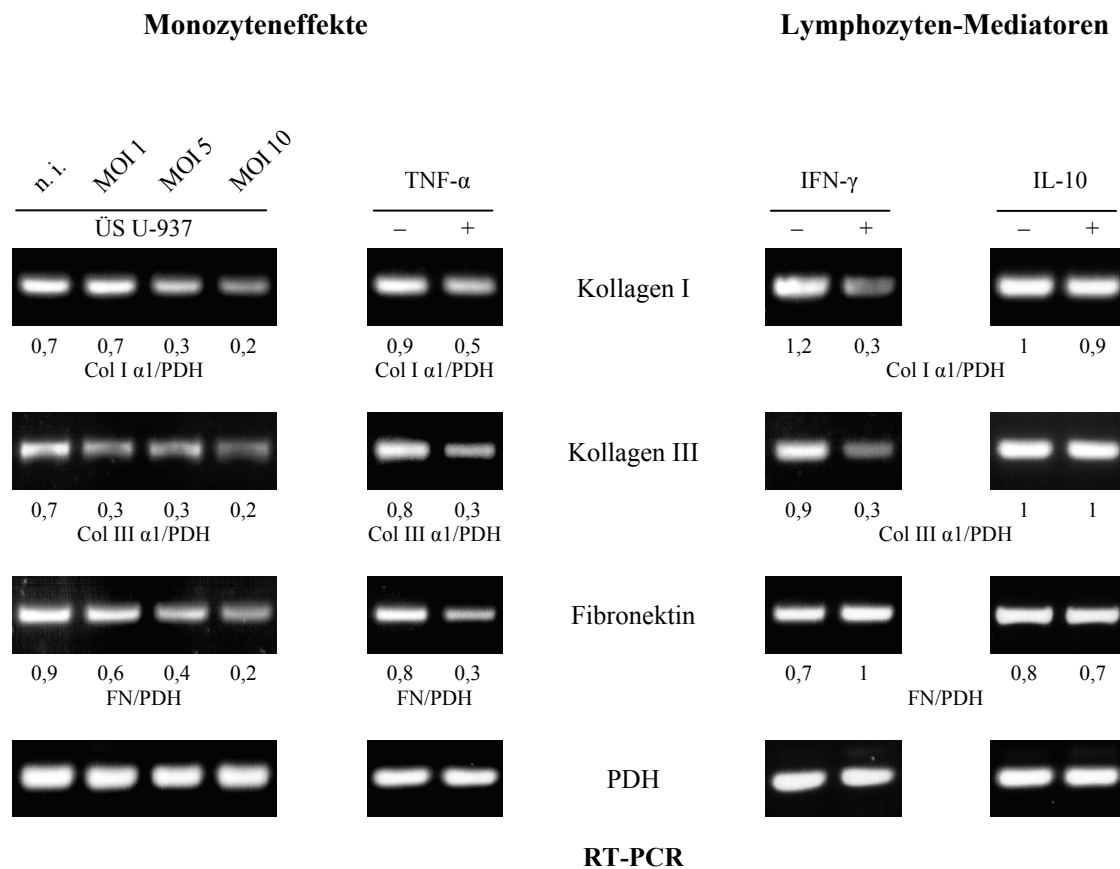
### Einfluss der Überstände infizierter Leukozyten auf Fibroblasten

Die Inkubation nicht infizierter Fibroblasten mit Überständen von infizierten PBMC eines gesunden Spenders führte in Abhängigkeit von der Infektionsdosis zur zunehmenden Inhibition der mRNA-Synthese von Kollagen I, III, V und Fibronectin. Die Transkription von Kollagen IV wurde auch hier nicht beeinflusst (Abb. 22).

Da es sich bei PBMC um die Gesamtfraktion aller Leukozyten handelt, sollten die möglichen Einflüsse von Monozyten/Makrophagen sowie von Lymphozyten und die verantwortlichen löslichen Faktoren näher spezifiziert werden. Hierfür wurden Monozyten der Zelllinie U-937 mit *C. pneumoniae* infiziert und die Wirkung der Überstände auf die Transkription der betrachteten Matrixproteine bei nicht infizierten Fibroblasten untersucht.



**Abb. 22:** Wirkung der Überstände infizierter PBMC auf die mRNA-Synthese von extrazellulären Matrixproteinen bei nicht infizierten Fibroblasten. Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Infektion.



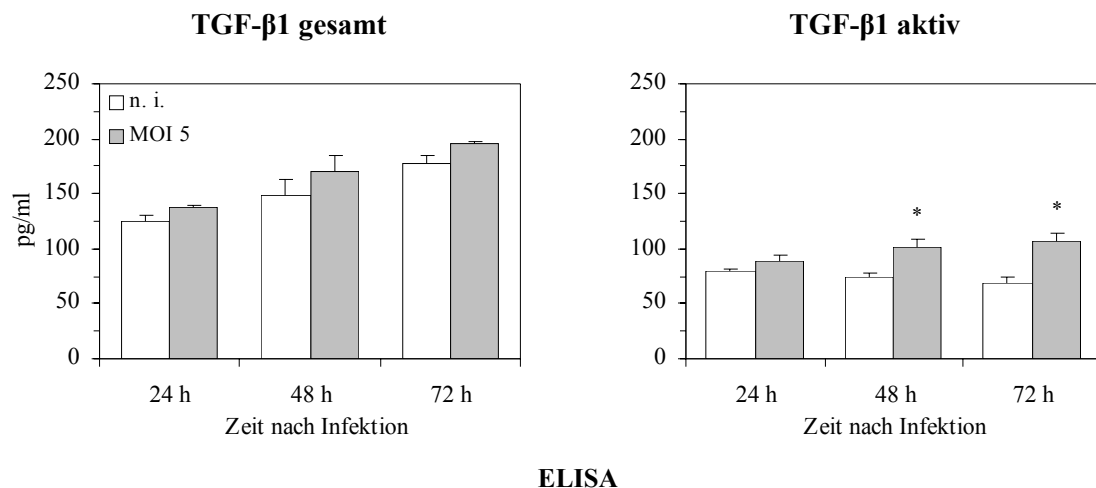
**Abb. 23:** Beeinflussung der Matrixproteinsynthese von Fibroblasten durch aktivierte Leukozyten: Überstände von infizierten U-937-Zellen und TNF-α als Beispiele für Monozyteneffekte; IFN-γ und IL-10 sind wichtige Lymphozyten-Mediatoren bei Infektionen mit *C. pneumoniae*. Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Zytokin-Stimulation bzw. der Inkubation mit konditioniertem Medium.

Nicht infizierte Zellen wurden außerdem mit TNF-α stimuliert, welches eines der wichtigsten Effaktormoleküle aktivierter Makrophagen ist. Die Überstände von infizierten U-937-Zellen führten dosisabhängig zur verringerten Transkription der Matrixproteine bei Fibroblasten. Auch nach Stimulation mit TNF-α konnte dieser Effekt beobachtet werden.

Darüber hinaus wurden nicht infizierte Fibroblasten mit den Zytokinen IFN-γ und IL-10 stimuliert, da diese wichtige Lymphozyten-assoziierte Mediatoren bei Chlamydien-Infektionen sind. IFN-γ führte bei den Kollagenen I und III zu einer Inhibition der mRNA-Synthese, wohingegen die Transkription von Fibronectin im Vergleich zur Kontrolle leicht stimuliert wurde. Die Behandlung mit IL-10 hatte keine Auswirkung auf das mRNA-Niveau der untersuchten Matrixproteine (Abb. 23).

### Bildung und Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 durch chlamydieninfizierte Fibroblasten

TGF- $\beta$ 1 ist eines der wichtigsten profibrotischen Zytokine (Flanders & Roberts, 2001). Zur Untersuchung der Rolle dieses Faktors bei einer Infektion mit *C. pneumoniae* erfolgte die Detektion bei infizierten Epithelzellen und Fibroblasten mittels ELISA. Bereits bei nicht infizierten Fibroblasten konnte TGF- $\beta$ 1 im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Nach 48 h wurden signifikant erhöhte Mengen der aktiven Form dieses Zytokins bei infizierten Zellen gefunden. Dagegen gab es keine Unterschiede bei der Gesamt-Konzentration zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen (Abb. 24). In den Überständen von WISH-Zellen wurde kein TGF- $\beta$ 1 nachgewiesen.

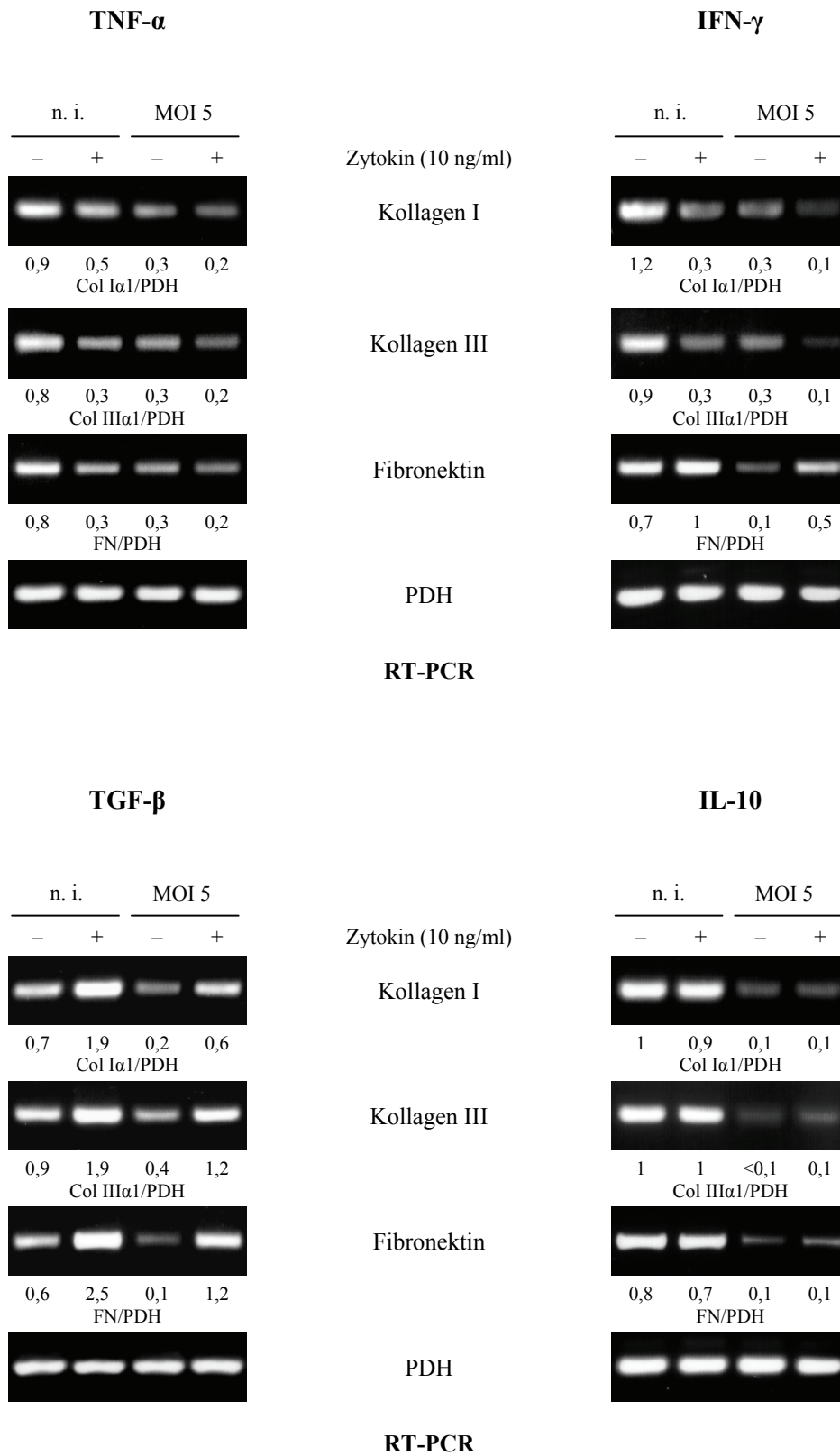


**Abb. 24:** Nachweis von Gesamt-TGF- $\beta$ 1 sowie der biologisch aktiven Form in den Kulturüberständen von nicht infizierten und infizierten Fibroblasten. \*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Student t-Test;  $n = 4$ ).

### 3.4. Zusammenwirken von Infektion und Mediatoren der Immunantwort

Um das Zusammenwirken von Infektion und verschiedenen Mediatoren der Immunantwort zu untersuchen, wurden infizierte Zellen zusätzlich mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 sowie TGF- $\beta$  stimuliert. Die Effekte auf nicht infizierte Zellen wurden zum Vergleich gegenübergestellt.

Nach der Inkubation mit TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  kam es zu einer weiteren Reduktion der mRNA-Expression oder im Falle von Fibronectin bei Stimulation mit IFN- $\gamma$  zur Gegenregulation der Infektionswirkung (Abb. 25). IL-10 hatte weder einen Einfluss auf nicht infizierte noch auf infizierte Zellen. Die Behandlung von nicht infizierten Zellen mit TGF- $\beta$  führte zu einer gesteigerten Kollagen- und Fibronectin-Transkription und auch die Effekte der Infektion wurden gegenreguliert, so dass ein ähnliches mRNA-Niveau wie bei den Kontrollzellen vorzufinden war.

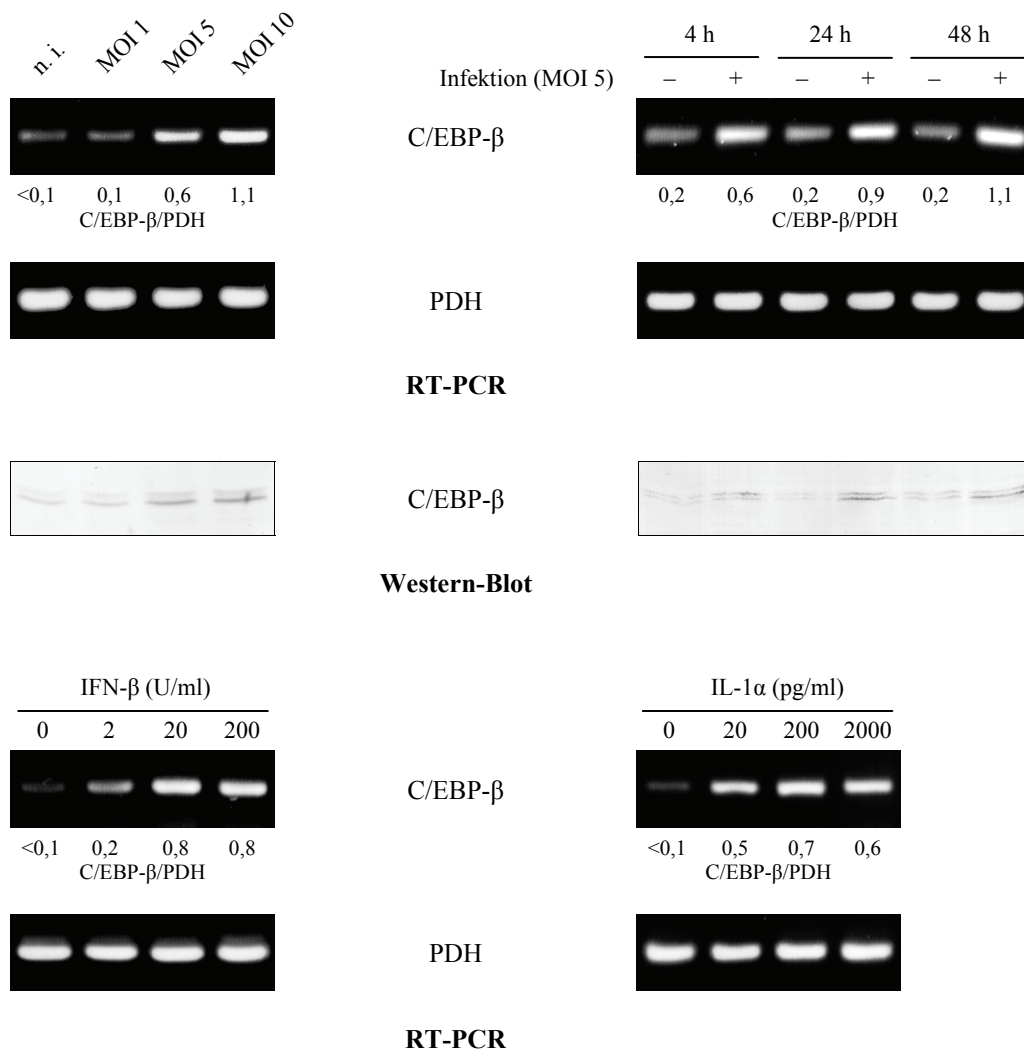


**Abb. 25:** Effekte der Immunmediatoren TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  und IL-10 auf die Transkription extrazellulärer Matrixproteine bei nicht infizierten und infizierten Fibroblasten. Die Probenahme erfolgte 24 h nach der Infektion und Zytokin-Stimulation.

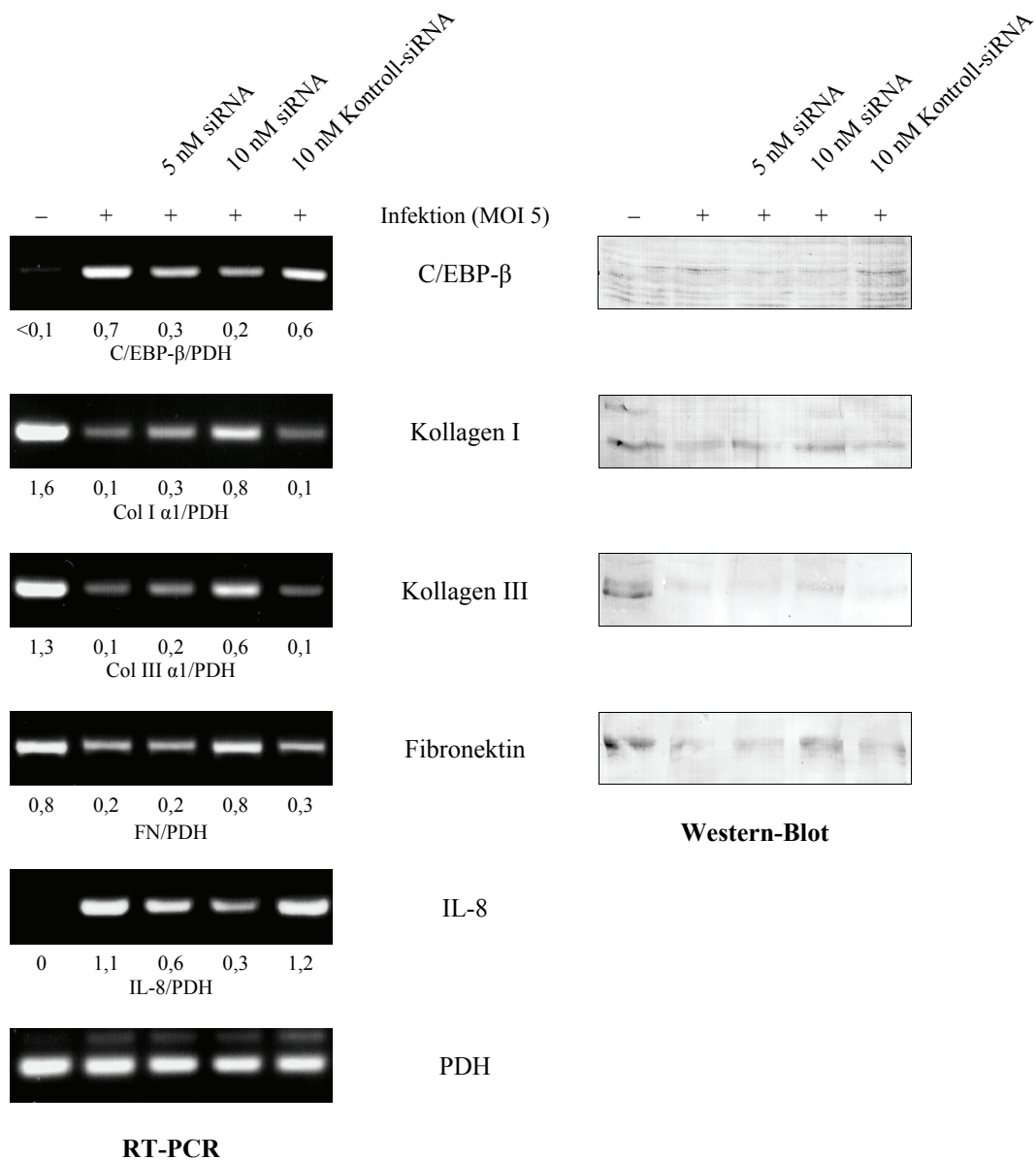


### 3.5. C/EBP- $\beta$ als Faktor der Matrixproteinregulation durch *C. pneumoniae*

Der Transkriptionsfaktor C/EBP- $\beta$ , der durch verschiedene Entzündungsmediatoren aktiviert wird, scheint eine zentrale Funktion bei der Inhibition von Kollagen I zu haben (Ghosh *et al.*, 2006). Die Infektion induzierte bei Fibroblasten die mRNA- und Proteinsynthese von C/EBP- $\beta$ , die auch noch nach 48 h im Vergleich zu nicht infizierten Zellen deutlich erhöht waren (Abb. 26). Die Überstände von infizierten Fibroblasten und WISH-Zellen hatten den gleichen Effekt auf nicht infizierte Fibroblasten (nicht dargestellt). Sowohl durch die Stimulation mit IFN- $\beta$  als auch IL-1 $\alpha$  konnte die Transkription von C/EBP- $\beta$  bei nicht infizierten Fibroblasten induziert werden (Abb. 26).



**Abb. 26:** Induktion des Transkriptionsfaktors C/EBP- $\beta$  durch die Infektion mit *C. pneumoniae* sowie durch die Zytokine IFN- $\beta$  und IL-1 $\alpha$  bei Fibroblasten. Die Probenahme für die RT-PCR erfolgte 24 h nach der Infektion und Zytokin-Stimulation bzw. nach den angegebenen Zeiträumen. Für den Protein-Nachweis wurden die Zellen 48 h nach der Infektion bzw. nach den angegebenen Zeiträumen lysiert.



**Abb. 27:** Inhibition der Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP- $\beta$  mittels siRNA: Auswirkung auf die mRNA- und Proteinsynthese von extrazellulären Matrixproteinen sowie auf die Transkription von IL-8 (Positivkontrolle). Die Probenahme für die RT-PCR erfolgte 24 h nach der Infektion. Für den Protein-Nachweis wurden die Zellen 48 h nach der Infektion lysiert.

Bei Fibroblasten, die mit C/EBP- $\beta$  siRNA transfiziert wurden, ließen sich nach der Infektion nur noch deutlich verringerte mRNA- und Proteinmengen dieses Transkriptionsfaktors nachweisen. Die Kollagenproduktion stieg hier wieder an, war im Vergleich zu nicht infizierten Zellen aber noch leicht vermindert. Die Synthese von Fibronectin erreichte dagegen nahezu das Niveau nicht infizierter Zellen. Die durch die Infektion induzierbare Transkription des Zytokins IL-8, in die auch C/EBP- $\beta$  involviert ist (Positivkontrolle), nahm bei den transfizierten Zellen stark ab (Abb. 27).

## 4. Diskussion

Persistente Infektionen mit *C. pneumoniae* werden mit der Pathogenese von Asthma, Atherosklerose oder COPD in Verbindung gebracht. Ein wichtiges Merkmal dieser chronisch verlaufenden entzündlichen Erkrankungen sind strukturelle Umbauprozesse des Gewebes, die zu einer irreversiblen Einschränkung der Lungenfunktion bzw. zur Behinderung des Blutstromes in den Gefäßen führen und mit einer veränderten Synthese von extrazellulären Matrixproteinen durch glatte Muskelzellen und Fibroblasten verbunden sind. Chlamydien können in vitro neben Epithelzellen diese mesenchymalen Zellen infizieren und hier ihren Entwicklungszyklus mit der Bildung von Einschlusskörpern durchlaufen (Maass *et al.*, 2000). In vivo erfolgte der Nachweis von *C. pneumoniae* in Adventitiafibroblasten (Higuchi *et al.*, 2000) und in glatten Muskelzellen atherosklerotischer Plaques (Shor *et al.*, 1992; Shor & Phillips, 2000; Yamashita *et al.*, 1998) mittels immunhistochemischer Methoden sowie Licht- und Elektronenmikroskopie. Auch in der Lunge scheinen Mesenchymzellen wichtige Wirtszellen für Chlamydien zu sein (Reinhold *et al.*, 2008). Bei den für die eigenen Versuche verwendeten glatten Muskelzellen und Fibroblasten führte die Infektion zur Vermehrung der Chlamydien und zur Bildung von Einschlusskörpern. Fibroblasten könnten möglicherweise die Etablierung von persistenten Infektionen fördern, da im Vergleich zu glatten Muskelzellen meist nur verhältnismäßig kleine und schwach fluoreszierende Inklusionen gefunden wurden und die Infektionsraten bei diesem Zelltyp sehr gering waren.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* bei mesenchymalen Zellen die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen beeinflusst. Nach der Infektion wurden bei beiden Zelltypen nur noch deutlich verringerte mRNA- und Proteinmengen der fibrillären Kollagene I, III und V sowie des Basalmembranproteins Fibronectin nachgewiesen. Die Überstände infizierter Fibroblasten regulierten die mRNA-Expression dieser Matrixproteine bei nicht infizierten Zellen in gleicher Weise wie die direkte Infektion, was auf induzierte lösliche Mediatoren zurückzuführen war.

Epithelzellen sind primäre Zielzellen für Chlamydien und werden durch die Infektion aktiviert (Jahn *et al.*, 2000; Rasmussen *et al.*, 1997). Diese Zellen produzierten nur das Basalmembranprotein Kollagen IV sowie Kollagen V und Fibronectin, deren Synthese durch die Infektion nicht wesentlich beeinflusst wurde. Interaktionen zwischen aktivierten Epithelzellen und mesenchymalen Zellen sind für Remodeling-Prozesse in den Atemwegen von besonderer Bedeutung und beruhen vor allem auf parakrinen Effekten von

freigesetzten löslichen Mediatoren (Knight, 2001; Zhang *et al.*, 1999). Die Inkubation von Fibroblasten mit konditioniertem Medium infizierter Epithelzellen beeinflusste die Transkription der untersuchten Matrixproteine, so dass auch hier lösliche Faktoren eine wichtige Rolle spielen.

Die Elementarkörperchen werden nach dem Eintritt in den Respirationstrakt von Alveolarmakrophagen aufgenommen. Chlamydien aktivieren auch diese Zellen (La Verda & Byrne, 1994). Aktivierte Makrophagen sowie T-Lymphozyten haben eine zentrale Bedeutung bei der Atherosklerose und chronischen Atemwegserkrankungen, da sie durch die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zur lokalen Entzündung und zu Remodeling-Prozessen beitragen (Hansson, 2001; Vignola *et al.*, 1996). Einige dieser Faktoren können auch durch *C. pneumoniae* induziert werden (Kaukoranta-Tolvanen *et al.*, 1996b; Redecke *et al.*, 1998). Bei den eigenen Versuchen bewirkten die Überstände von infizierten Leukozyten ebenfalls eine Verringerung der mRNA-Synthese der untersuchten Matrixproteine mit Ausnahme von Kollagen IV, dessen Transkription nicht beeinflusst wurde.

### **Der Einfluss von löslichen Mediatoren auf die Matrixproteinsynthese**

Da bei Fibroblasten trotz der geringen Infektionsraten eine starke Hemmung der Matrixprotein-Synthese feststellbar war, scheinen parakrine Effekte eine wichtige Rolle zu spielen. Auch das konditionierte Medium von infizierten Epithelzellen und Fibroblasten bewirkte eine Verringerung Genexpression. Deshalb wurden verschiedene lösliche Mediatoren untersucht, die durch die Infektion mit *C. pneumoniae* induziert werden und für die bereits eine inhibitorische Wirkung auf die Kollagen-Synthese beschrieben wurde.

PGE<sub>2</sub> wird in großen Mengen von infizierten Epithelzellen und glatten Muskelzellen produziert (Jahn *et al.*, 2000; Rödel *et al.*, 2004; Yoneda *et al.*, 2003) und kann zur Suppression der Kollagen I-Expression beitragen (Riquet *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 1987). Die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese hatte jedoch keinen Einfluss auf die Transkription der untersuchten Matrixproteine. Auch durch die Neutralisation der Zytokine IL-8, GRO- $\alpha$  und bFGF konnten weder die Effekte der Infektion noch von konditioniertem Medium infizierter Zellen aufgehoben oder minimiert werden, so dass diese Mediatoren ebenfalls nicht für die Matrixprotein-Inhibition in Frage kommen.

Darüber hinaus kann IFN- $\beta$  die Matrixprotein-Synthese unterdrücken (Duncan & Berman, 1985; Tanabe *et al.*, 2007). Die Neutralisation dieses von infizierten Epithel- und Mesenchymzellen produzierten Zytokins (Lad *et al.*, 2005; Rödel *et al.*, 2001) verringerte

bei infizierten Fibroblasten die Inhibition der Matrixprotein-Transkription; bei neutralisierten Überständen von infizierten Epithelzellen konnte jedoch kein Effekt festgestellt werden. Diese Zellen produzieren aber im Gegensatz zu Fibroblasten IL-1 $\alpha$  (Al-Mously & Eley, 2007; Rasmussen *et al.*, 1997). Für IL-1 wurde sowohl eine stimulatorische als auch eine inhibitorische Wirkung auf die Synthese von Matrixproteinen beschrieben (Amento *et al.*, 1991; Curfs *et al.*, 1997; Postlethwaite *et al.*, 1988). Durch die Neutralisationsversuche konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\alpha$  für die beobachtete Inhibitionswirkung des konditionierten Epithelzellmediums auf die Matrixprotein-Expression verantwortlich ist. Dies soll in erster Linie über induziertes PGE<sub>2</sub> vermittelt werden (Diaz *et al.*, 1993; Riquet *et al.*, 2000). Da die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch NS-398 keine Effekte hatte, scheint dieser Mechanismus nicht relevant zu sein.

Die Suppression der Matrixprotein-Synthese durch Überstände von infizierten Monozyten und Leukozyten könnten u. a. die Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 verursachen, welche durch die Infektion induziert werden (Caspar-Bauguil *et al.*, 2000; Gaydos, 2000; Kaukoranta-Tolvanen *et al.*, 1996b; Redecke *et al.*, 1998). TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden vor allem von aktivierten Makrophagen produziert; IFN- $\gamma$  und IL-10 sind Lymphozyten-assoziierte Zytokine. Die Behandlung mit TNF- $\alpha$  führt bei Fibroblasten zu einer verringerten Synthese interstitieller Kollagene (Mauviel *et al.*, 1991; Solis-Herruzo *et al.*, 1988) und auch IFN- $\gamma$  sowie IL-10 bewirkten in verschiedenen Untersuchungen eine Inhibition von Matrixproteinen (Diaz & Jimenez, 1997; Duncan & Berman, 1985; Moroguchi *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2001).

Die getesteten Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  hatten im Wesentlichen den gleichen Einfluss auf die Expression der Matrixproteine wie die Überstände von Monozyten und Leukozyten. Die durch IFN- $\gamma$  verursachte Induktion von Fibronektin wurde auch in einer Untersuchung von Varga *et al.* (1990) festgestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Yamamoto *et al.* (2001) und Moroguchi *et al.* (2004) hatte IL-10 keine Effekte auf die Matrixprotein-Transkription. Letztendlich kann vermutet werden, dass die bei einer Chlamydieninfektion von aktivierten Makrophagen und T-Zellen produzierten Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  maßgeblich für die Inhibitionswirkung der Überstände von Leukozyten verantwortlich zu sein scheinen.

Ein wichtiger Faktor, der verschiedene Zelltypen im Rahmen einer Chlamydien-Infektion aktivieren kann, ist das chlamydiale Hitzeschockprotein 60 (cHsp60), welches homolog zum Protein GroEL von *E. coli* ist. Die Aminosäuresequenzen dieses Proteins sind bei *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* zu 95 % identisch (Kikuta *et al.*, 1991). Chlamydiales

Hsp60 wirkt stark immunogen und stimuliert u. a. die Produktion von IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  oder MMP-9 (Kol *et al.*, 1999; Kol *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2006). Hsp60 wird von Chlamydien in beträchtlichen Mengen bei der Vermehrung gebildet und konnte als freies Protein in den Inklusionen sowie im Überstand von infizierten Epithelzellen nachgewiesen werden (Costa *et al.*, 2002). Durch die Bindung dieses Proteins an Toll-like-Rezeptoren (TLR), die als Sensoren bei der unspezifischen Abwehr von Bedeutung sind (Werling & Jungi, 2003), erfolgt die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen und die Initiation der zellulären Antwort (Bulut *et al.*, 2002; Kol *et al.*, 1999; Kol *et al.*, 2000). Die Stimulation von Fibroblasten mit cHsp60 führte zwar zur Induktion von MMP-1, hatte aber keine Auswirkungen auf die mRNA-Synthese der interstitiellen Kollagene sowie von Fibronectin. Auch die in die Inhibition der Matrixprotein-Transkription involvierten Mediatoren IL-1 $\alpha$  und IFN- $\beta$  wurden durch dieses Protein nicht induziert. Es ist daher anzunehmen, dass die durch cHsp60 bei Fibroblasten aktivierten Zytokine und Signaltransduktionswege für die Regulation dieser Matrixproteine nicht ausreichend sind.

### **Molekulare Mechanismen der Kollagenregulation durch *C. pneumoniae***

Durch Hitze oder UV-Licht inaktivierte Chlamydien waren nicht mehr zur Inhibition der Kollagen- und Fibronectin-Synthese befähigt. Da LPS bei Hitzeinwirkung nicht denaturiert wird, hat es demnach keinen Effekt auf die Expression der untersuchten Matrixproteine. Mit UV-Licht behandelte Elementarkörperchen sind noch in der Lage, an Rezeptoren der Zelloberfläche zu binden und können von Wirtszellen auch noch phagozytiert werden (Byrne & Moulder, 1978). Die bei diesen Ereignissen aktivierten Signalwege reichen offenbar für die Beeinflussung der Matrixprotein-Expression nicht aus, so dass hierfür eine bakterielle Proteinsynthese erforderlich zu sein scheint.

Bei Fibroblasten führte sowohl die Infektion als auch die Behandlung mit den Zytokinen IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  zu einer verringerten Synthese interstitieller Kollagene. Es wurde vermutet, dass für den Infektionseffekt die gleichen Signalwege und Faktoren wie bei der Zytokin-Behandlung verantwortlich sein könnten. Deshalb soll zunächst auf die molekularen Mechanismen der Inhibition von Kollagen I durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eingegangen werden. Die Regulation dieses häufigsten extrazellulären Matrixproteins wird bisher am besten verstanden.

Die Wirkung von IFN- $\gamma$  auf die Genexpression wird vor allem über den JAK-STAT-Weg vermittelt (Ivashkiv & Hu, 2004). Nach Phosphorylierung durch die Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen 1 (JAK1) und JAK2 lagern sich die signal transducers and activators of

transcription 1 (STAT1) zu Homodimeren zusammen und wandern in den Zellkern. Hier binden sie an spezifische Promotor-Sequenzen (IFN- $\gamma$  activated sequence, GAS) ihrer Zielgene, was deren Transkription aktiviert (Aaronson & Horvath, 2002). STAT-DNA-Interaktionen finden bei der Regulation von Kollagen I aber offenbar nicht statt (Ghosh, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  die Genexpression auch über einen alternativen Signalweg unter Einbeziehung des Transkriptionsfaktors CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP- $\beta$ ) regulieren kann. Dieser gehört zu einer Familie von strukturell und funktionell ähnlichen Proteinen, die eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Ereignissen, wie Wachstum und Differenzierung sowie bei Entzündungsprozessen spielen (Lekstrom-Himes & Xanthopoulos, 1998). Sie besitzen neben einer Aktivierungsdomäne eine hochkonservierte Leuzin-Reißverschluss-Domäne, die der Dimerisierung und DNA-Bindung dient (Ramji & Foka, 2002).

IFN- $\gamma$  induziert die Neusynthese von C/EBP- $\beta$  und fördert dessen Bindung an das gamma-activated transcriptional element (GATE) im Promotor von Zielgenen, welches sich von den STAT-Bindungsstellen unterscheidet (Weihua *et al.*, 1997). Hierfür ist zusätzlich die posttranslationale Phosphorylierung von C/EBP- $\beta$  erforderlich. Dies geschieht durch die extrazellulären Rezeptorkinasen 1 und 2 (ERK1/2), die ebenfalls durch IFN- $\gamma$  aktiviert werden und somit in die GATE-abhängige Genexpression involviert sind (Hu *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2002).

In einer kürzlich publizierten Untersuchung zeigten Ghosh *et al.* (2006), dass bei Fibroblasten die Inhibition von Kollagen I durch IFN- $\gamma$  hauptsächlich über C/EBP- $\beta$  unter Beteiligung von ERK 1/2 geregelt wird. Auch TNF- $\alpha$  scheint die Transkription von Kollagen I vor allem über C/EBP- $\beta$  zu inhibieren (Greenwel *et al.*, 2000; Iraburu *et al.*, 2000). Die nach der TNF- $\alpha$ -induzierten Aktivierung von ERK1/2 festgestellte Verringerung der Kollagen I-Expression (Reunanen *et al.*, 2000) könnte somit ebenfalls durch C/EBP- $\beta$  vermittelt werden. Ausgehend von diesen Beobachtungen scheint C/EBP- $\beta$  eine Schlüssel-funktion bei der Inhibition der Kollagensynthese durch verschiedene Mediatoren und Signalwege zu haben (Abb. 28). Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch bisher nicht bekannt.

C/EBP- $\beta$  spielt auch eine wichtige Rolle bei der Induktion von Zielgenen der Typ I-Interferone (IFN- $\alpha/\beta$ ), die über den Faktorenkomplex IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) vermittelt wird. Dieser besteht aus STAT1, STAT2 und der DNA-bindenden Untereinheit ISGF3 $\gamma$ , welche das interferon stimulated response element (ISRE) im Promotor erkennt. Die von IFN- $\gamma$  stimulierte Expression dieses Faktors wird maßgeblich über

C/EBP- $\beta$  reguliert (Weihua *et al.*, 2001). *C. pneumoniae* ist ebenfalls in der Lage, die Transkription von ISGF3 $\gamma$  zu induzieren (Rödel *et al.*, 2001). Deshalb wurde vermutet, dass C/EBP- $\beta$  durch *C. pneumoniae* aktiviert wird und an der Kollagenregulation bei infizierten Zellen beteiligt sein könnte. Für die Induktion von IL-8 durch *C. trachomatis* scheint C/EBP- $\beta$  eine wichtige Funktion zu haben, da Mutationen in der C/EBP- $\beta$ -Bindungsstelle des IL-8-Promotors zu einer drastischen Verringerung der Genexpression führen (Buchholz & Stephens, 2006). Die Infektion, Überstände infizierter Zellen, sowie die für die Matrixproteinregulation verantwortlichen Zytokine IL-1 $\alpha$  und IFN- $\beta$  bewirkten bei Fibroblasten die Induktion von C/EBP- $\beta$ . Die Inhibition dieses Faktors mit Hilfe von spezifischer siRNA führte bei infizierten Zellen auch wieder zu einem Anstieg der mRNA- und Proteinsynthese von Kollagen I, III und Fibronektin, so dass die Regulation der Matrixproteine bei einer Chlamydieninfektion offensichtlich maßgeblich über C/EBP- $\beta$  vermittelt wird. Zudem wurde bei transfizierten Zellen nach der Infektion eine verringerte IL-8-Transkription festgestellt, was die Ergebnisse von Buchholz & Stephens (2006) ergänzt und bestätigt.

Der verringerte Nachweis von Matrixproteinen bei infizierten Zellen könnte auch auf den Abbau durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zurückführbar sein. Diese strukturell ähnlichen Endopeptidasen werden als inaktive Zymogene gebildet und besitzen ein Zink-Ion in ihrem katalytischen Zentrum (Shapiro & Senior, 1999). MMP-1 (interstitielle Kollagenase) leitet den Abbau von Kollagen I und III ein; die entstandenen Fragmente werden durch andere MMPs weiter degradiert (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Obwohl eine MMP-Induktion bei infizierten Zellen stattfindet (Rödel *et al.*, 2003), scheint ausgehend von den übereinstimmenden PCR- und Western-Blot-Ergebnissen der Abbau der Matrixproteine von untergeordneter Bedeutung zu sein, was auch mit neutralisierenden MMP-1 Antikörpern am Beispiel von Kollagen I und III gezeigt werden konnte. Die Regulation findet *in vitro* offensichtlich im Wesentlichen auf der Transkriptionsebene statt.

### **Die Rolle von TGF- $\beta$ bei *C. pneumoniae* Infektionen**

Eine integrale Funktion bei fibrotischen Veränderungen von verschiedenen Organen wie Lunge, Niere, Leber und Haut hat der Mediator TGF- $\beta$ . Dieser Faktor stimuliert die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen, inhibiert die Expression der Matrixabbauenden MMPs und führt zur erhöhten Synthese von MMP-Inhibitoren (TIMPs) (Border & Noble, 1994). Es existieren drei Isoformen: TGF- $\beta$ 1, 2 und 3, die strukturell und funktionell sehr ähnlich sind. Die Zellen der meisten Gewebe produzieren alle Isoformen



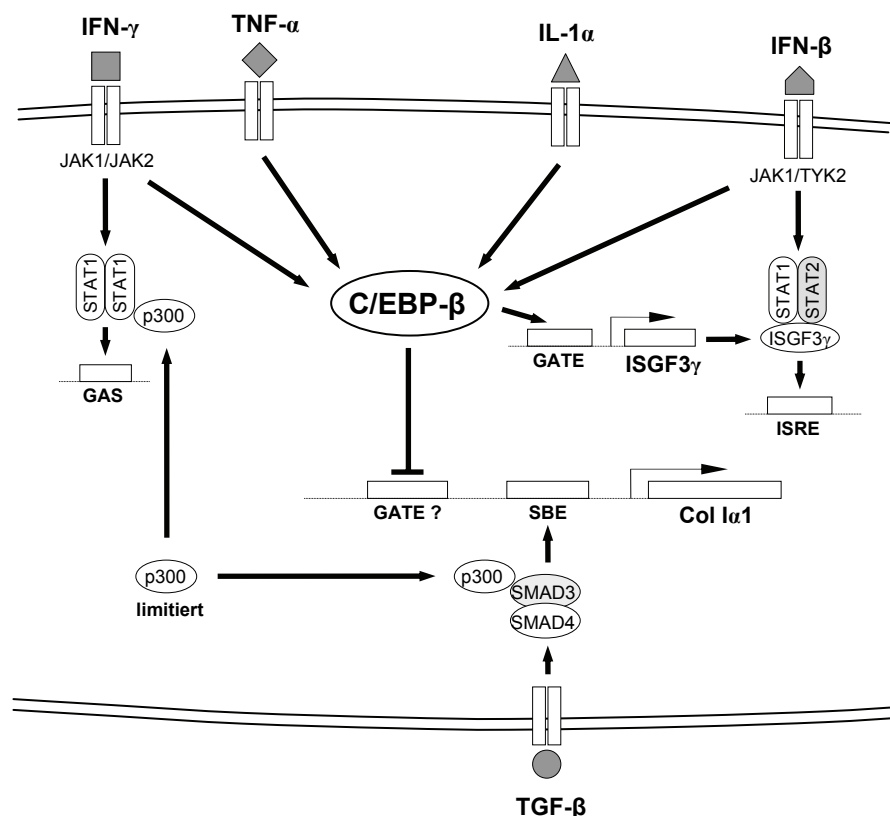
mit einigen Unterschieden in der Expressionshöhe. TGF- $\beta$  wird als inaktives Präkursormolekül (latentes TGF- $\beta$ ) synthetisiert und freigesetzt. Die Aktivierung erfolgt extrazellulär durch die Abspaltung von nicht kovalent gebundenen dimeren Präkursorresten (Latency associated protein, LAP). Das geschieht in einem komplexen und noch nicht vollständig verstandenen Prozess durch Proteasen wie Plasmin, MMP-2, MMP-3 oder MMP-9 (Gleizes *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 2001; Yu & Stamenkovic, 2000). Dieser Vorgang ist entscheidend für die Regulation der Aktivität dieses Faktors.

Bei Asthma und chronischer Bronchitis (klinische Manifestation von COPD) korreliert die Expression von TGF- $\beta$  mit der Dicke der Basalmembran bzw. der subepithelialen Fibroblastenanzahl sowie mit der Schwere der Erkrankung (Minshall *et al.*, 1997; Vignola *et al.*, 1997). TGF- $\beta$  konnte bei Patienten mit verschiedenen Formen von Lungenfibrose im interstitiellen Gewebe direkt unterhalb des Alveolarepithels nachgewiesen werden (Corrin *et al.*, 1994). Dieses Zytokin kann von geschädigten Bronchialepithelzellen und auch von aktivierten inflammatorischen Zellen, wie Alveolarmakrophagen oder Eosinophilen produziert werden und beeinflusst die Matrixproteinsynthese mesenchymaler Zellen (Knight, 2001; Minshall *et al.*, 1997; Vignola *et al.*, 1996). Bei der Atherosklerose trägt TGF- $\beta$  wahrscheinlich wesentlich zur Plaqueformation und Plaquestabilität bei (Bobik, 2006; Mallat & Tedgui, 2002).

Bei den durchgeführten Versuchen war dieses Zytokins in den Überständen von nicht infizierten sowie infizierten Epithelzellen nicht nachweisbar, so dass eine Induktion oder Aktivierung durch die Infektion offensichtlich nicht erfolgt. Im Gegensatz dazu konnte von Dakama *et al.* (2003) bei Bronchialepithelzellen, die mit dem respiratorischen Infektionserreger *Mycoplasma pneumoniae* infiziert wurden, eine Induktion von TGF- $\beta$  festgestellt werden. Bei Fibroblasten führte die Infektion zu einer Erhöhung der Konzentration von aktivem TGF- $\beta$  im Kulturüberstand. Auch Rödel *et al.* (1998b) fanden bei Synovialzellen eine Aktivierung dieses Zytokins durch die Infektion mit *C. trachomatis*. Bei Mäusen, die intranasal mit einem murinen *C. trachomatis* Biovar (MoPn) infiziert wurden, konnten erhöhte Konzentrationen der aktiven TGF- $\beta$ -Form in der bronchioalveolären Lavage detektiert werden (Williams *et al.*, 1996). Bei Monozyten scheint die Infektion entweder keinen Einfluss auf die Expression dieses Zytokins zu haben oder sogar eine Inhibition zu bewirken (Caspar-Bauguil *et al.*, 2000; Mamata *et al.*, 2005). Trotz der Aktivierung von latentem TGF- $\beta$  führte die Infektion mit *C. pneumoniae* bei Fibroblasten zu einer Verringerung der Matrixproteinsynthese. Da auch die Überstände infizierter Epithelzellen und Leukozyten die Matrixproteinsynthese von nicht infizierten Fibroblasten inhibierten,

überwiegen bei potentiellen Wirtszellen offenbar Mediatoren, die letztlich eine Verringerung der Genexpression bewirken.

Die durch die Infektion verursachte Inhibition der Matrixproteinsynthese wurde durch TGF- $\beta$  teilweise kompensiert. Dieser Faktor aktiviert Mediatoren der SMAD-Familie (SMAD3 und 4), die an das SMAD-binding element (SBE) in den Promotoren von Matrixprotein-Genen binden und die Transkription induzieren (Verrecchia & Mauviel, 2007). Außerdem findet bei gleichzeitiger Stimulation von Fibroblasten mit IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  eine Konkurrenz zwischen STAT1 und dem Komplex SMAD3/4 um den in der Zelle limitierten Koaktivator p300 statt (Ghosh *et al.*, 2001). Auf diese Weise scheint letztlich die Netto-Kollagensynthese reguliert zu werden (Abb. 28). Da Chlamydien neben C/EBP- $\beta$  auch den JAK-STAT-Weg aktivieren können (Lad *et al.*, 2005; Rothfuchs *et al.*, 2006), sind ähnliche Mechanismen bei einer Infektion mit diesem Erreger denkbar.



**Abb. 28:** Beeinflussung der Expression von Kollagen I durch verschiedene Signalwege: Der Transkriptionsfaktor C/EBP- $\beta$  hat eine zentrale Bedeutung für die Inhibition der Transkription durch die Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\alpha$ . TGF- $\beta$  stimuliert die Kollagen-Transkription über den SMAD-Weg. Eine weitere Modulation des Netto-Effektes findet durch Konkurrenz um den limitierten Koaktivator p300 statt. GAS - gamma activated sequence, GATE - gamma activated transcriptional element, ISRE - IFN stimulated response element, SBE - SMAD-binding element.

### Diskussion der Ergebnisse im Kontext von Asthma, COPD und Atherosklerose

Die durch Remodeling-Prozesse bedingte Obstruktion der Atemwege führt bei Asthma und COPD zu Ventilationsstörungen und damit zu einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion. Aufgrund der höheren Strömungswiderstände ist das forcierte Expirationsvolumen pro Sekunde (FEV<sub>1</sub>) geringer als bei gesunden Personen gleichen Alters. Bei Erwachsenen mit intrinsischem (nicht atopischen) Asthma konnten von Black *et al.* (2000) und Huittinen *et al.* (2001) Korrelationen zwischen serologischen Markern einer Chlamydieninfektion und der Verringerung des FEV<sub>1</sub> festgestellt werden. Auch in anderen Studien korrelierten serologisch diagnostizierte Chlamydieninfektionen (IgG + IgA positiv) mit der beschleunigten Abnahme der Lungenfunktion bei Patienten mit intrinsischem Asthma (Pasternack *et al.*, 2005; ten Brinke *et al.*, 2001). Diese Assoziationen erlauben jedoch keine Aussagen zur tatsächlichen pathogenetischen Bedeutung von *C. pneumoniae*, da positive IgG-Antikörper-Titer lediglich eine stattgefundene Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Erreger anzeigen und offensichtlich auch IgA kein verlässlicher Marker einer chronischen Infektion ist (Dowell *et al.*, 2001). Das Vorliegen einer chronisch aktiven Infektion ist daher allein durch den Direktnachweis des Erregers im Gewebe gesichert, wofür letztlich nur die PCR geeignet zu sein scheint (Dowell *et al.*, 2001). Die fehlende Standardisierung und häufig unzureichende Validierung der eingesetzten Verfahren ist allerdings auch als problematisch anzusehen und liefert möglicherweise eine Erklärung für die ebenfalls kontroversen Resultate unterschiedlicher Studien (Johnston & Martin, 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *C. pneumoniae* in der Lage ist, die Synthese extrazellulärer Matrixproteine in potentiellen Zielzellen zu beeinflussen und somit bei chronisch entzündlichen Erkrankungen maßgeblich auf Umbauprozesse des betroffenen Gewebes einwirken könnte. Es war allerdings bei keinem der durchgeführten Experimente eine gesteigerte Matrixproteinproduktion durch den direkten oder indirekten Einfluss der Infektion festzustellen. Mit Ausnahme von Kollagen IV wurde stets nur eine Abnahme beobachtet. Wie sind diese Resultate zu bewerten? Ausgehend von dem in der Einleitung vorgestellten alternativen Konzept der Chlamydienpathogenese, das der aktivierten Wirtszelle eine Schlüsselfunktion im Krankheitsgeschehen zukommen lässt (Stephens, 2003), könnten Untersuchungen bestätigt werden, die Infektionen mit *C. pneumoniae* nicht als Ursache von progressiven Atemwegsobstruktionen ansehen (Lieberman *et al.*, 2001; Strachan *et al.*, 2000).

Ein wesentliches Merkmal von Asthma ist das  $T_{H2}$ -ähnliche Zytokinmuster der T-Helferzellen (Mazzarella *et al.*, 2000). Charakteristische  $T_{H2}$ -Zytokine, wie IL-4 oder IL-13 können maßgeblich zur Induktion extrazellulärer Matrixproteine beitragen (Kaviratne *et al.*, 2004; Postlethwaite *et al.*, 1992). Darüber hinaus stimulieren sie die Freisetzung von TGF- $\beta$  durch Epithelzellen sowie die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten (Richter *et al.*, 2001), die ebenfalls ein bedeutendes Reservoir für TGF- $\beta$  sind und deshalb eine wichtige Funktion bei Remodelingprozessen haben (Gomes *et al.*, 2005; Minshall *et al.*, 1997). Weiterhin fördert dieses Zytokinmilieu die alternative Aktivierung von Makrophagen. Alternativ aktivierte Makrophagen sind durch die erhöhte Expression von Rezeptoren mit breiter Spezifität für Antigene, wie z. B. den Mannose-Rezeptor und die verbesserte Fähigkeit zur Antigenaufnahme und -präsentation gekennzeichnet (Gordon, 2003). Gleichzeitig besitzen sie immunsuppressive und antiinflammatorische Eigenschaften und können neben TGF- $\beta$  auch die proliferativ und profibrotisch wirkenden Zytokine PDGF-AA und BB synthetisieren (Song *et al.*, 2000a). Alternativ aktivierte Makrophagen sind in der Lunge insbesondere bei chronisch entzündlichen Prozessen zu finden (Fireman *et al.*, 1988).

Chlamydien induzieren beim Menschen und im Mausmodell die Synthese von IFN- $\gamma$  durch T- und NK-Zellen (Halme *et al.*, 2000; Penttilä *et al.*, 1998; Tseng & Rank, 1998), was für eine effektive Bekämpfung der Infektion von großer Bedeutung ist (Rottenberg *et al.*, 2002). Eosinophile werden normalerweise nicht aktiviert (Pizzichini *et al.*, 1997).  $T_{H2}$ -Zytokine unterdrücken jedoch über verschiedene Wege diese protektive Immunantwort (Romagnani, 2001). Deshalb könnten Asthmatiker empfänglicher für eine Infektion mit *C. pneumoniae* sein. Ein solcher Zusammenhang wurde bereits für Rhinovirus-Infektionen beschrieben (Papadopoulos *et al.*, 2002). Asthmatiker mit einer stärker polarisierten  $T_{H2}$ -Antwort sind möglicherweise häufiger von einer chronischen Infektion betroffen, da bei diesen die IFN- $\gamma$ -Synthese noch niedriger als bei Personen mit einem weniger stark ausgeprägten  $T_{H2}$ -Zytokinprofil ist. Zudem könnte hierdurch die Bildung von antichlamydialen Antikörpern gefördert werden. Ein ähnlicher Zusammenhang könnte bei COPD bestehen, da das Rauchen als eine der Hauptursachen dieser Krankheit die Immunabwehr beeinflusst (Sopori & Kozak, 1998). Zigarettenrauch unterdrückt z. B. die Induktion einer  $T_{H1}$ -Antwort durch LPS-stimulierte dendritische Zellen, und PBMC von Rauchern produzieren verstärkt IL-4, was die Aktivität von NK-Zellen negativ beeinflusst (Byron *et al.*, 1994; Marcenaro *et al.*, 2005; Vassallo *et al.*, 2005). Bei Rauchern und COPD-Patienten ist auch die Expression von TLR 2 auf Alveolarmakrophagen vermindert

(Droemann *et al.*, 2005). Da Chlamydien die Freisetzung von Immunmediatoren wesentlich über TLR 2 stimulieren (Netea *et al.*, 2002; Prebeck *et al.*, 2001), könnte dies ebenfalls zur erhöhten Empfänglichkeit für eine Infektion beitragen. So ließe sich auch die Korrelation zwischen Rauchen und positiven Antikörpertitern gegen Chlamydien bzw. dem Nachweis von *C. pneumoniae* DNA in PBMC erklären (Hahn & Golubjatnikov, 1992; Karvonen *et al.*, 1994).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und der dargestellten Zusammenhänge ist anzunehmen, dass die Infektion von potentiellen Wirtszellen nicht die Ursache von fibrotischen Veränderungen ist, sondern dass ein bereits bestehendes profibrotisch wirkendes T<sub>H2</sub>-Zytokinmilieu eine effektive Abwehr der Chlamydien verhindert sowie die Antikörperantwort begünstigt, was letztlich zu höheren Detektionsraten und Antikörpertitern bei Patienten mit Asthma und COPD führt. Andererseits könnte die beobachtete Inhibition der Matrixproteinsynthese aber trotzdem zu Atemwegsobstruktionen sowie zum Remodeling in der Lunge beitragen. Bindegewebe versteift die Bronchialwände und behindert sowohl die Kontraktion als auch die gleichzeitig stattfindende Verdickung der glatten Muskelzellen (Meiss, 1999; Milanese *et al.*, 2001). Eine Verringerung der extrazellulären Matrix könnte zu einem Kollabieren der Bronchiolen beim forcierten Ausatmen sowie bei entsprechenden Stimuli zu einer stärkeren Muskelkontraktion und Verengung der Atemwege führen.

Eine klinische Manifestation von COPD ist das Lungenemphysem, welches durch eine irreversible Vergrößerung der peripheren Lufträume aufgrund der Zerstörung von Alveolen und Lungensepten charakterisiert ist (Barnes, 2000). Der damit verbundene Elastizitätsverlust der Lunge sowie die wegen der verringerten radialen Zugkräfte eingeschränkte Durchgängigkeit der Bronchiolen bewirken ebenfalls eine Behinderung des Luftstromes und führen zu einer starken Beeinträchtigung des Gasaustauschs (Barnes, 2000; Rennard, 1998). *C. pneumoniae* wurde in Gewebeschnitten von Patienten mit COPD mittels Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie in Bronchiolen, Makrophagen sowie in Alveolarwandbereichen mit schweren Destruktionen detektiert (Theegarten *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000). Eine ursächliche Beteiligung an diesem Geschehen wäre neben der Induktion von MMPs auch durch eine Inhibition der Kollagensynthese denkbar. Dies würde Untersuchungen bestätigen, die Korrelationen zwischen dem COPD-Schweregrad und chronischen *C. pneumoniae*-Infektionen (IgA + PCR positiv) fanden (Blasi *et al.*, 2002; Kurashima *et al.*, 2005; von Hertzen *et al.*, 1997).

Remodeling-Prozesse spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Atherosklerose. Die Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen ist ein Hauptmerkmal des Plaquewachstums. Als Folge der Plaquebildung entstehen arterielle Stenosen. Diese sind aber relativ selten für akute klinische Komplikationen wie einen akuten Myokardinfarkt oder Schlaganfall verantwortlich. Große Atherome können lange Zeit unauffällig sein oder nur stabile Symptome, wie z. B. stabile Angina pectoris bei erhöhter Anstrengung bewirken. Die Mehrzahl akuter Myokardinfarkte resultiert von Plaques, die weniger als eine 50-70 %ige Stenose der Arterien verursachen (Falk *et al.*, 1995; Hackett *et al.*, 1988). Vielmehr scheinen die Zusammensetzung und die Verletzbarkeit (Vulnerabilität) der atherosklerotischen Läsion und nicht deren Größe die entscheidenden Faktoren zu sein, da diese die biomechanischen Eigenschaften und damit die Stabilität der Plaque beeinflussen (Rohde & Lee, 2003).

Vulnerable Plaques sind durch charakteristische histomorphologische Merkmale gekennzeichnet. Sie haben im Verhältnis zum Volumen einen relativ großen weichen Kern ( $\geq 40$  % Plaquevolumen) aus Cholesterin, Cholesterinestern und oxidierten Lipiden, der auch große Mengen tissue factor (TF) enthält. Die fibröse Kappe ist dünn, enthält wenig glatte Muskelzellen und hat einen geringen Kollagengehalt. In der Übergangsregion zur angrenzenden Intima, der sogenannten „Schulter“, finden sich Infiltrationen von aktivierten Entzündungszellen, insbesondere Makrophagen und T-Zellen (Shah, 2003). Diese bilden die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die neben der Inhibition der Kollagensynthese auch die Expression von MMPs stimulieren sowie die Apoptose von glatten Muskelzellen induzieren (Geng *et al.*, 1996; Siwik *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2001). So wird die fibröse Kappe besonders in diesem Bereich geschwächt. Inflammatorische Prozesse fördern daher wesentlich die Entstehung vulnerabler Plaques (Libby *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1994; van der Wal *et al.*, 1994). Die mechanische Widerstandsfähigkeit einer solchen Läsion ist erheblich vermindert, was die Anfälligkeit für eine Plaqueruptur stark erhöht. Bei diesem Ereignis wird durch den Einriss der dünnen Kappe sowie durch die Freisetzung von TF die Gerinnungskaskade aktiviert und es bildet sich ein Thrombus. Die damit verbundene plötzliche Vergrößerung der Plaque führt zur starken Einschränkung oder kompletten Unterbrechung des Blutstromes und es kommt zu den bereits genannten klinischen Ereignissen.

Anhand dieser Zusammenhänge scheint es deshalb von besonderer Bedeutung zu sein, auf welche Weise *C. pneumoniae* die Vulnerabilität bereits bestehender Läsionen beeinflussen könnte und so möglicherweise zu den klinischen Komplikationen der

Atherosklerose beiträgt. Rödel *et al.* (2004) zeigten im Gegensatz zu den in der Einleitung genannten Arbeiten, dass Überstände von *C. pneumoniae*-infizierten glatten Muskelzellen die Proliferation nicht infizierter Zellen hemmen, was auf die verstärkte Produktion von PGE<sub>2</sub> durch Induktion des Enzyms COX-2 zurückzuführen ist. Zudem wird bei infizierten glatten Muskelzellen die Expression des PDGF-Rezeptors  $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) inhibiert (Rödel *et al.*, 2007). Bei diesen Zellen wird durch die Infektion auch die Transkription von MMP-1 und MMP-3 aktiviert und es lassen sich erhöhte Konzentrationen der aktiven Enzyme in den Kulturüberständen nachweisen (Rödel *et al.*, 2003). Bereits erwähnt wurde die Freisetzung von MMP-9 durch infizierte Makrophagen (Vehmaan-Kreula *et al.*, 2001). Mittels Immunhistochemie konnte in atherosklerotischen Plaques von Patienten eine erhöhte Reaktivität gegenüber Cox-2 und MMP-9 in der unmittelbaren Umgebung von Bereichen gefunden werden, die auch reaktiv für *C. pneumoniae* waren (Song *et al.*, 2000b). Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte verringerte Kollagensynthese durch infizierte mesenchymale Zellen liefert nun ein weiteres gewichtiges Argument für einen möglichen Beitrag von *C. pneumoniae* zur Entstehung instabiler Plaques. Für das humane Cytomegalievirus (CMV), welches ebenfalls mit der Pathogenese der Atherosklerose assoziiert wird und teilweise zusammen mit *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Läsionen zu finden ist (Virok *et al.*, 2006), konnte vor kurzem auch eine inhibitorische Wirkung auf die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen nachgewiesen werden (Reinhardt *et al.*, 2006).

In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Chlamydieninfektion die lokale Entzündungsreaktion in der Plaque stimulieren könnte, z. B. durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Chemokinen bei Endothelzellen. Dies fördert die transendotheliale Migration von Leukozyten in die Intima (Kaukoranta-Tolvanen *et al.*, 1996a; Krüll *et al.*, 1999; Molestina *et al.*, 1999). Die durch die Infektion oder Antigenaufnahme bzw. -präsentation aktivierten Makrophagen und T-Zellen könnten ebenfalls zur Inhibition der Kollagensynthese beitragen. Aus Plaques von Patienten mit klinischen Symptomen wurden T-Zellen isoliert, die durch Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* aktiviert wurden und IFN- $\gamma$  sezernierten (de Boer *et al.*, 2000). An anderer Stelle wurde schon beschrieben, dass bei infizierten Makrophagen TNF- $\alpha$  induziert wird und auch chlamydiales Hsp60, welches in Makrophagen atherosklerotischer Plaques detektiert werden konnte, die Bildung dieses Zytokins stimuliert (Heinemann *et al.*, 1996; Kol *et al.*, 1998). Bei den eigenen Versuchen bewirkten TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  eine Verringerung der Matrixprotein-Transkription bei nicht infizierten und bei infizierten Zellen. So sind letzten

Endes vielfältige Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen sowie zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen denkbar, welche die Matrixprotein-Synthese in der Plaque beeinflussen könnten.

Alle diese Ergebnisse werden durch tierexperimentelle Untersuchungen bestätigt. Bei LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen mit genetisch bedingter Hypercholesterinämie, die intravasal mit *C. pneumoniae* infiziert wurden, konnte eine verminderte Anzahl von glatten Muskelzellen, ein geringerer Kollagengehalt und eine erhöhte Anzahl an Makrophagen in den induzierten Läsionen gegenüber den nicht infizierten Tieren nachgewiesen werden (Hauer *et al.*, 2006). In einer anderen Arbeit führte die intraperitoneale Infektion von LDL-Rezeptor/ApoE-Knockout-Mäusen zu Plaques mit einem geringeren Anteil an glatten Muskelzellen und einer dünneren fibrösen Kappe, in denen zudem erhöhte Mengen von MMP-2 und MMP-9 zu finden waren (Ezzahiri *et al.*, 2003).

Auch eine Reihe von Studien, in denen *C. pneumoniae* mittels PCR oder Immunhistochemie in atherosklerotischen Läsionen von Patienten mit einer klinischen Symptomatik nachgewiesen wurde, unterstützen die Hypothese einer möglicherweise entscheidenden Rolle dieses Erregers bei der Entstehung instabiler Plaques (reviewed in Mussa *et al.*, 2006). Es gibt allerdings auch Untersuchungen, die diese Theorie nicht bekräftigen (Daus *et al.*, 1998; Lindholt *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999).

Auf einen anderen Aspekt soll noch eingegangen werden. Die extrazelluläre Matrix dient nicht nur zur mechanischen Unterstützung der Organstruktur, sondern kann auch auf verschiedene zelluläre Funktionen einwirken. Matrixproteine steigern die Proliferation von glatten Muskelzellen und erhöhen außerdem die proliferative Wirkung von Wachstumsfaktoren (Bonacci *et al.*, 2003; Hirst *et al.*, 2000). Durch die Inhibition der Matrixprotein-Synthese könnte *C. pneumoniae* diese Vorgänge vielleicht beeinflussen. Die extrazelluläre Matrix liefert darüber hinaus Überlebenssignale (Freyer *et al.*, 2001). Der Verlust von Zell-Matrix-Kontakten induziert Anoikie („Heimatlosigkeit“), eine Form der Apoptose (Frisch & Francis, 1994). Apoptotische Prozesse scheinen zur Vulnerabilität von atherosklerotischen Plaques (Clarke & Bennett, 2006; Michel, 2003) und zur Entwicklung des Lungenemphysems beizutragen (Demedts *et al.*, 2006; Plataki *et al.*, 2006). Eine verringerte Kollagensynthese führt zudem zur Desorganisation des Zytoskeletts bei glatten Muskelzellen, so dass die Fähigkeit zur Migration stark eingeschränkt ist (Rocnik *et al.*, 1998). *C. pneumoniae* könnte deshalb auch auf diesem Weg zur Verringerung der Proliferation sowie zur verminderten Wirkung von Wachstumsfaktoren, zur Erhöhung der Apoptoserate und zur eingeschränkten Migration von Zellen beitragen.



Die Infektion der Wirtszelle erzeugt ein Zytokinmilieu, welches die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen inhibieren kann. Dadurch wird möglicherweise die Dissemination von infektiösen Elementarkörpern gefördert und die Einwanderung von Entzündungszellen in das Gewebe erleichtert. Bei einer chronischen Infektion der Atemwege scheint die subepitheliale Akkumulation von Matrixproteinen offenbar keine Folge der direkten Wirtszellantwort zu sein, sondern wird vermutlich sekundär über die zelluläre Immunität oder postinfektiöse Reparaturmechanismen vermittelt. Andererseits könnte der Infektionseffekt aber auch zu klinischen Manifestationen, wie z. B. dem Lungenemphysem beitragen. Bei der Atherosklerose wird auf diese Weise vielleicht die Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques begünstigt.

## 5. Zusammenfassung

Das obligat intrazelluläre Bakterium *Chlamydia pneumoniae* wird mit chronisch respiratorischen Erkrankungen wie COPD oder dem intrinsischen Asthma bronchiale und darüber hinaus vor allem mit der Atherosklerose assoziiert. Ein gemeinsames Merkmal dieser Krankheiten sind chronische Entzündungsprozesse, die zu einer verstärkten Bildung von Bindegewebe führen. In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Zellkulturmodell der Einfluss von *C. pneumoniae* auf die Synthese der extrazellulären Matrixproteine Kollagen I, III, IV, V und Fibronectin untersucht, da diese als strukturelle Hauptbestandteile des Bindegewebes, vor allem bei fibrotischen Veränderungen, induziert werden.

Bei Epithelzellen wurde die Expression von Matrixproteinen durch die Infektion kaum beeinflusst und auch das profibrotisch wirkende Zytokin TGF- $\beta$  war nicht nachweisbar. Die Überstände der infizierten Zellen inhibierten jedoch bei Fibroblasten die Synthese der Kollagentypen I, III und V sowie von Fibronectin. Durch neutralisierende Antikörper konnte gezeigt werden, dass hierfür das Zytokin IL-1 $\alpha$  verantwortlich war. Bei infizierten Fibroblasten kam es trotz der Aktivierung von TGF- $\beta$  ebenfalls zu einer Hemmung der Matrixproteinsynthese. Die gleichen Effekte konnten bei glatten Muskelzellen beobachtet werden. Auch die Überstände von infizierten Fibroblasten und Leukozyten bewirkten bei nicht infizierten Zellen eine Verringerung der Kollagen- und Fibronectin-Expression. Induziertes IFN- $\beta$  vermittelte die Wirkung des konditionierten Mediums von Fibroblasten; bei aktivierten Makrophagen und T-Zellen scheinen die Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  eine wichtige Rolle zu spielen. Die Behandlung mit diesen Zytokinen führte bei infizierten Zellen zu einer weiteren Abnahme der Matrixprotein-Transkription. Im Gegensatz dazu wirkte die Stimulation mit TGF- $\beta$  dem Infektionseffekt entgegen. Die Synthese des Basalmembranproteins Kollagen IV blieb bei Fibroblasten stets unverändert, nur bei infizierten glatten Muskelzellen fand eine Inhibition statt. Für die Beeinflussung der Matrixprotein-Expression scheint eine bakterielle Proteinsynthese erforderlich zu sein. Chlamydiales Hsp60 ist für die beobachteten Effekte jedoch nicht verantwortlich. Der Transkriptionsfaktor C/EBP- $\beta$  hat eine zentrale Bedeutung bei der Signalübertragung, da dieser durch die Infektion, durch die Überstände von infizierten Zellen sowie durch die Mediatoren IL-1 $\alpha$  und IFN- $\beta$  induziert werden konnte und die Inhibition mit spezifischer siRNA bei infizierten Fibroblasten wieder zu einem Anstieg der Kollagen- und Fibronectin-Synthese führte.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann vermutet werden, dass die Zytokin-Antwort der Wirtszelle bei einer Infektion mit *C. pneumoniae* keine fibrotischen Veränderungen der Atemwege und keine Akkumulation von Matrixproteinen in atherosklerotischen Plaques bewirkt. Eine verringerte Matrixprotein-Synthese könnte aber ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion beitragen oder die Entstehung von instabilen vulnerablen Plaques fördern. Die Untersuchungen unterstützen deshalb die Hypothese einer möglichen pathogenetischen Bedeutung dieses Erregers für chronische Atemwegserkrankungen sowie für die Atherosklerose.

## 6. Summery

The obligate intracellular bacterium *Chlamydia pneumoniae* has been associated with chronic respiratory diseases like COPD or intrinsic asthma and furthermore with atherosclerosis. Chronic inflammatory processes are common features of these disorders, leading to an enhanced formation of connective tissue. In this work the influence of *C. pneumoniae* was investigated on synthesis of extracellular matrix proteins collagen type I, III, IV, V and fibronectin, because these proteins are main structural components of connective tissue and become induced in fibrotic diseases.

In epithelial cells, expression of matrix proteins was not remarkably influenced by infection and the profibrotic cytokine TGF- $\beta$  was not detectable in the supernatants. However, conditioned medium of infected cells inhibited the synthesis of collagen types I, III and V as well as fibronectin. By using blocking antibodies, IL-1 $\alpha$  was found to be responsible for this effect. Despite activation of TGF- $\beta$  the synthesis of matrix proteins was also diminished in infected fibroblasts. The same results were observed in smooth muscle cells. Supernatants of infected fibroblasts or leukocytes also decreased expression of collagen and fibronectin. Induced IFN- $\beta$  mediated the effects of conditioned medium from fibroblasts; whereas the inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  seem to play an important role in activated macrophages and T-lymphocytes. In infected cells, treatment with these cytokines further down-regulated the transcription of matrix proteins. In contrast, stimulation with TGF- $\beta$  counteracted chlamydial effects. In fibroblasts, synthesis of the basal membrane protein collagen type IV remained constant; the production was reduced only in infected smooth muscle cells. Bacterial protein synthesis seems to be necessary for modulation of matrix protein expression, but chlamydial Hsp60 is not responsible for this. The transcription factor C/EBP- $\beta$  has a central role in signal transduction, because it can be induced by infection, supernatants of infected cells as well as mediators IL-1 $\alpha$  and IFN- $\beta$ . In addition, specific siRNA targeting this factor diminished inhibition of matrix protein synthesis.

Based on these findings it can be assumed that *C. pneumoniae*-induced host cell cytokine response does not stimulate fibrotic changes in the airways or does not result in accumulation of extracellular matrix proteins in atherosclerotic plaques respectively. On the other hand, decreased matrix protein synthesis could contribute to lung function impairment or could promote formation of vulnerable atherosclerotic plaques. Therefore, the results support the hypothesis of a pathogenic role of this organism in chronic obstructive lung diseases and atherosclerosis.

## 7. Literatur

- Aaronson, D.S. & Horvath, C.M. (2002): A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**: 1653-5.
- Airenne, S.; Surcel, H.M.; Alakarppa, H.; Laitinen, K.; Paavonen, J.; Saikku, P. & Laurila, A. (1999): *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes. *Infect Immun* **67**: 1445-9.
- Airenne, S.; Surcel, H.M.; Tuukkanen, J.; Leinonen, M. & Saikku, P. (2002): *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand J Immunol* **55**: 390-8.
- Aldous, M.B.; Grayston, J.T.; Wang, S.P. & Foy, H.M. (1992): Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966-1979. *J Infect Dis* **166**: 646-9.
- Al-Mously, N. & Eley, A. (2007): Interaction of *Chlamydia trachomatis* serovar E with male genital tract epithelium results in secretion of proinflammatory cytokines. *J Med Microbiol* **56**: 1025-32.
- Amento, E.P.; Ehsani, N.; Palmer, H. & Libby, P. (1991): Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* **11**: 1223-30.
- Barbour, A.G.; Amano, K.; Hackstadt, T.; Perry, L. & Caldwell, H.D. (1982): *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol* **151**: 420-8.
- Barnes, P.J. (2000): Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **343**: 269-80.
- Beatty, W.L.; Byrne, G.I. & Morrison, R.P. (1993): Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3998-4002.
- Beatty, W.L.; Belanger, T.A.; Desai, A.A.; Morrison, R.P. & Byrne, G.I. (1994): Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun* **62**: 3705-11.
- Beatty, W.L.; Morrison, R.P. & Byrne, G.I. (1995): Reactivation of persistent *Chlamydia trachomatis* infection in cell culture. *Infect Immun* **63**: 199-205.
- Birk, D.E. (2001): Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* **32**: 223-37.
- Birkedal-Hansen, H.; Moore, W.G.; Bodden, M.K.; Windsor, L.J.; Birkedal-Hansen, B.; DeCarlo, A. & Engler, J.A. (1993): Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* **4**: 197-250.
- Black, P.N.; Scicchitano, R.; Jenkins, C.R.; Blasi, F.; Allegra, L.; Wlodarczyk, J. & Cooper, B.C. (2000): Serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae* is related to the severity of asthma. *Eur Respir J* **15**: 254-9.
- Blasi, F.; Cosentini, R. & Tarsia, P. (2000): *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *Curr Opin Infect Dis* **13**: 161-164.
- Blasi, F.; Damato, S.; Cosentini, R.; Tarsia, P.; Raccanelli, R.; Centanni, S. & Allegra, L. (2002): *Chlamydia pneumoniae* and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment. *Thorax* **57**: 672-6.
- Bobik, A. (2006): Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 1712-20.
- Bonacci, J.V.; Harris, T. & Stewart, A.G. (2003): Impact of extracellular matrix and strain on proliferation of bovine airway smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**: 324-8.

- Border, W.A. & Noble, N.A.** (1994): Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **331**: 1286-92.
- Bosse, Y.; Thompson, C.; Stankova, J. & Rola-Pleszczynski, M.** (2006): Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**: 746-53.
- Brewster, C.E.; Howarth, P.H.; Djukanovic, R.; Wilson, J.; Holgate, S.T. & Roche, W.R.** (1990): Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **3**: 507-11.
- Buchholz, K.R. & Stephens, R.S.** (2006): Activation of the host cell proinflammatory interleukin-8 response by *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol* **8**: 1768-79.
- Bulut, Y.; Faure, E.; Thomas, L.; Karahashi, H.; Michelsen, K.S.; Equils, O.; Morrison, S.G.; Morrison, R.P. & Arditi, M.** (2002): Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol* **168**: 1435-40.
- Burgess, J.K.; Johnson, P.R.; Ge, Q.; Au, W.W.; Poniris, M.H.; McParland, B.E.; King, G.; Roth, M. & Black, J.L.** (2003): Expression of connective tissue growth factor in asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 71-7.
- Burkhardt, O.; Straube, E. & Welte, T.** (2003): Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie der Chlamydien-Pneumonie. *Pneumologie* **57**: 449-58.
- Byrne, G.I. & Moulder, J.W.** (1978): Parasite-specified phagocytosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* by L and HeLa cells. *Infect Immun* **19**: 598-606.
- Byron, K.A.; Varigos, G.A. & Wootton, A.M.** (1994): IL-4 production is increased in cigarette smokers. *Clin Exp Immunol* **95**: 333-6.
- Campbell, L.A.; Blessing, E.; Rosenfeld, M.; Lin, T. & Kuo, C.C.** (2000a): Mouse models of *C. pneumoniae* infection and atherosclerosis. *J Infect Dis* **181 Suppl 3**: S508-13.
- Campbell, L.A.; Rosenfeld, M. & Kuo, C.C.** (2000b): The role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis - recent evidence from animal models. *Trends Microbiol* **8**: 255-7; discussion 257.
- Campbell, L.A. & Kuo, C.C.** (2004): *Chlamydia pneumoniae* - an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol* **2**: 23-32.
- Canty, E.G. & Kadler, K.E.** (2005): Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* **118**: 1341-53.
- Caspar-Bauguil, S.; Puissant, B.; Nazzari, D.; Lefevre, J.C.; Thomsen, M.; Salvayre, R. & Benoist, H.** (2000): *Chlamydia pneumoniae* induces interleukin-10 production that down-regulates major histocompatibility complex class I expression. *J Infect Dis* **182**: 1394-401.
- Chakir, J.; Shannon, J.; Molet, S.; Fukakusa, M.; Elias, J.; Laviolette, M.; Boulet, L.P. & Hamid, Q.** (2003): Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* **111**: 1293-8.
- Chung, K.F.** (2005): The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**: 347-54.
- Clarke, M. & Bennett, M.** (2006): The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am J Nephrol* **26**: 531-5.
- Clements, P.; Permin, H. & Norn, S.** (2002): *Chlamydia pneumoniae* infection and its role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Invest Allergol Clin Immunol* **12**: 73-9.

- Coombes, B.K. & Mahony, J.B.** (1999): *Chlamydia pneumoniae* infection of human endothelial cells induces proliferation of smooth muscle cells via an endothelial cell-derived soluble factor(s). *Infect Immun* **67**: 2909-15.
- Coombes, B.K. & Mahony, J.B.** (2001): cDNA array analysis of altered gene expression in human endothelial cells in response to *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect Immun* **69**: 1420-7.
- Corrin, B.; Butcher, D.; McAnulty, B.J.; Dubois, R.M.; Black, C.M.; Laurent, G.J. & Harrison, N.K.** (1994): Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in the lungs of patients with systemic sclerosis, cryptogenic fibrosing alveolitis and other lung disorders. *Histopathology* **24**: 145-50.
- Costa, C.P.; Kirschning, C.J.; Busch, D.; Durr, S.; Jennen, L.; Heinzmann, U.; Prebeck, S.; Wagner, H. & Miethke, T.** (2002): Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Immunol* **32**: 2460-70.
- Curfs, J.H.; Meis, J.F. & Hoogkamp-Korstanje, J.A.** (1997): A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* **10**: 742-80.
- Dakhama, A.; Kraft, M.; Martin, R.J. & Gelfand, E.W.** (2003): Induction of regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) and transforming growth factor-beta 1 in airway epithelial cells by *Mycoplasma pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**: 344-51.
- Daus, H.; Ozbek, C.; Saage, D.; Scheller, B.; Schieffer, H.; Pfreundschuh, M. & Gause, A.** (1998): Lack of evidence for a pathogenic role of *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus infection in coronary atheroma formation. *Cardiology* **90**: 83-8.
- Dautry-Varsat, A.; Subtil, A. & Hackstadt, T.** (2005): Recent insights into the mechanisms of *Chlamydia* entry. *Cell Microbiol* **7**: 1714-22.
- de Boer, O.J.; van der Wal, A.C.; Houtkamp, M.A.; Ossewaarde, J.M.; Teeling, P. & Becker, A.E.** (2000): Unstable atherosclerotic plaques contain T-cells that respond to *Chlamydia pneumoniae*. *Cardiovasc Res* **48**: 402-8.
- Demedts, I.K.; Demoor, T.; Bracke, K.R.; Joos, G.F. & Brusselle, G.G.** (2006): Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* **7**: 53.
- Diaz, A.; Munoz, E.; Johnston, R.; Korn, J.H. & Jimenez, S.A.** (1993): Regulation of human lung fibroblast alpha 1(I) procollagen gene expression by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and prostaglandin E2. *J Biol Chem* **268**: 10364-71.
- Diaz, A. & Jimenez, S.A.** (1997): Interferon-gamma regulates collagen and fibronectin gene expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 251-60.
- Dinarelli, C.A.** (1996): Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**: 2095-147.
- Dowell, S.F.; Peeling, R.W.; Boman, J.; Carlone, G.M.; Fields, B.S. et al.** (2001): Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* **33**: 492-503.
- Droemann, D.; Goldmann, T.; Tiedje, T.; Zabel, P.; Dalhoff, K. & Schaaf, B.** (2005): Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* **6**: 68.
- Duncan, M.R. & Berman, B.** (1985): Gamma interferon is the lymphokine and beta interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. *J Exp Med* **162**: 516-27.
- Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K. & Tuschl, T.** (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-8.
- Elliott, J.H.** (2001): Psittacosis. A flu like syndrome. *Aust Fam Physician* **30**: 739-41.

- Everett, K.D.; Bush, R.M. & Andersen, A.A. (1999): Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* **49** Pt 2: 415-40.
- Ezzahiri, R.; Stassen, F.R.; Kurvers, H.A.; van Pul, M.M.; Kitslaar, P.J. & Bruggeman, C.A. (2003): *Chlamydia pneumoniae* infection induces an unstable atherosclerotic plaque phenotype in LDL-receptor, ApoE double knockout mice. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **26**: 88-95.
- Falk, E.; Shah, P.K. & Fuster, V. (1995): Coronary plaque disruption. *Circulation* **92**: 657-71.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-11.
- Fireman, E.M.; Ben Efraim, S.; Greif, J.; Kivity, S. & Topilsky, M.R. (1988): Suppressor cell activity of human alveolar macrophages in interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* **73**: 111-6.
- Flanders, K.C. & Roberts, A.B. (2001): TGF-beta. In: *Cytokine Reference*. (eds J.J. Oppenheim & M. Feldmann), Vol. 1, Academic Press, San Diego, pp. 719-746.
- Fox, A.; Rogers, J.C.; Gilbert, J.; Morgan, S.; Davis, C.H.; Knight, S. & Wyrick, P.B. (1990): Muramic acid is not detectable in *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry. *Infect Immun* **58**: 835-7.
- Freyer, A.M.; Johnson, S.R. & Hall, I.P. (2001): Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**: 569-76.
- Frisch, S.M. & Francis, H. (1994): Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**: 619-26.
- Gaydos, C.A. (2000): Growth in vascular cells and cytokine production by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* **181** Suppl 3: S473-8.
- Geng, Y.J.; Wu, Q.; Muszynski, M.; Hansson, G.K. & Libby, P. (1996): Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**: 19-27.
- Gerard, H.C.; Freise, J.; Wang, Z.; Roberts, G.; Rudy, D. *et al.* (2002): *Chlamydia trachomatis* genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs. persistent infection. *Microbes Infect* **4**: 13-22.
- Gerbase, A.C.; Rowley, J.T. & Mertens, T.E. (1998): Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* **351** Suppl 3: 2-4.
- Ghosh, A.K.; Yuan, W.; Mori, Y.; Chen, S. & Varga, J. (2001): Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor-beta. Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators. *J Biol Chem* **276**: 11041-8.
- Ghosh, A.K. (2002): Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**: 301-14.
- Ghosh, A.K.; Bhattacharyya, S.; Mori, Y. & Varga, J. (2006): Inhibition of collagen gene expression by interferon-gamma: novel role of the CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta). *J Cell Physiol* **207**: 251-60.
- Gieffers, J.; van Zandbergen, G.; Rupp, J.; Sayk, F.; Kruger, S.; Ehlers, S.; Solbach, W. & Maass, M. (2004): Phagocytes transmit *Chlamydia pneumoniae* from the lungs to the vasculature. *Eur Respir J* **23**: 506-10.



- Gleizes, P.E.; Munger, J.S.; Nunes, I.; Harpel, J.G.; Mazziere, R.; Noguera, I. & Rifkin, D.B.** (1997): TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells* **15**: 190-7.
- Gomes, I.; Mathur, S.K.; Espenshade, B.M.; Mori, Y.; Varga, J. & Ackerman, S.J.** (2005): Eosinophil-fibroblast interactions induce fibroblast IL-6 secretion and extracellular matrix gene expression: implications in fibrogenesis. *J Allergy Clin Immunol* **116**: 796-804.
- Gordon, S.** (2003): Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**: 23-35.
- Greene, W.; Xiao, Y.; Huang, Y.; McClarty, G. & Zhong, G.** (2004): *Chlamydia*-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis. *Infect Immun* **72**: 451-60.
- Greenwel, P.; Tanaka, S.; Penkov, D.; Zhang, W.; Olive, M.; Moll, J.; Vinson, C.; Di Liberto, M. & Ramirez, F.** (2000): Tumor necrosis factor alpha inhibits type I collagen synthesis through repressive CCAAT/enhancer-binding proteins. *Mol Cell Biol* **20**: 912-8.
- Gupta, S.L.; Carlin, J.M.; Pyati, P.; Dai, W.; Pfefferkorn, E.R. & Murphy, M.J., Jr.** (1994): Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infect Immun* **62**: 2277-84.
- Hackett, D.; Davies, G. & Maseri, A.** (1988): Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *Eur Heart J* **9**: 1317-23.
- Hackstadt, T.; Rockey, D.D.; Heinzen, R.A. & Scidmore, M.A.** (1996): *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *Embo J* **15**: 964-77.
- Hahn, D.L. & Golubjatnikov, R.** (1992): Smoking is a potential confounder of the *Chlamydia pneumoniae*-coronary artery disease association. *Arterioscler Thromb* **12**: 945-7.
- Hahn, D.L.** (1999): *Chlamydia pneumoniae*, asthma, and COPD: what is the evidence? *Ann Allergy Asthma Immunol* **83**: 271-88, 291; quiz 291-2.
- Halme, S.; Latvala, J.; Karttunen, R.; Palatsi, I.; Saikku, P. & Surcel, H.M.** (2000): Cell-mediated immune response during primary *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect Immun* **68**: 7156-8.
- Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C.** (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-2.
- Han, S.; Ritzenthaler, J.D.; Rivera, H.N. & Roman, J.** (2005): Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands suppress fibronectin gene expression in human lung carcinoma cells: involvement of both CRE and Sp1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**: L419-28.
- Hansson, G.K.** (2001): Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 1876-90.
- Hatch, T.P.** (1996): Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *J Bacteriol* **178**: 1-5.
- Hauer, A.D.; de Vos, P.; Peterse, N.; ten Cate, H.; van Berkel, T.J.; Stassen, F.R. & Kuiper, J.** (2006): Delivery of *Chlamydia pneumoniae* to the vessel wall aggravates atherosclerosis in LDLr<sup>-/-</sup> mice. *Cardio-vasc Res* **69**: 280-8.
- Heinemann, M.; Susa, M.; Simnacher, U.; Marre, R. & Essig, A.** (1996): Growth of *Chlamydia pneumoniae* induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line. *Infect Immun* **64**: 4872-5.
- Higuchi, M.; Castelli, J.B.; Aiello, V.D.; Palomino, S.; Reis, M.M.; Sambiasi, N.V.; Fukasawa, S.; Bezerra, H.G. & Ramires, J.A.** (2000): Great amount of *C.pneumoniae* in ruptured plaque vessel segments at autopsy. A comparative study with stable plaques. *Arq Bras Cardiol* **74**: 149-51.

- Hirono, S.; Dibrov, E.; Hurtado, C.; Kostenuk, A.; Ducas, R. & Pierce, G.N. (2003): *Chlamydia pneumoniae* stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of endogenous heat shock protein 60. *Circ Res* **93**: 710-6.
- Hirst, S.J.; Twort, C.H. & Lee, T.H. (2000): Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**: 335-44.
- Hogan, R.J.; Mathews, S.A.; Mukhopadhyay, S.; Summersgill, J.T. & Timms, P. (2004): Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* **72**: 1843-55.
- Homma, J.; Yamanaka, R.; Yajima, N.; Tsuchiya, N.; Genkai, N.; Sano, M. & Tanaka, R. (2006): Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein beta correlates with prognosis in glioma patients. *Oncol Rep* **15**: 595-601.
- Hu, J.; Roy, S.K.; Shapiro, P.S.; Rodig, S.R.; Reddy, S.P.; Platanias, L.C.; Schreiber, R.D. & Kalvakolanu, D.V. (2001): ERK1 and ERK2 activate CCAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* **276**: 287-97.
- Hudson, B.G.; Reeders, S.T. & Tryggvason, K. (1993): Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* **268**: 26033-6.
- Huittinen, T.; Hahn, D.; Anttila, T.; Wahlstrom, E.; Saikku, P. & Leinonen, M. (2001): Host immune response to *Chlamydia pneumoniae* heat shock protein 60 is associated with asthma. *Eur Respir J* **17**: 1078-82.
- Iliffe-Lee, E.R. & McClarty, G. (1999): Glucose metabolism in *Chlamydia trachomatis*: the 'energy parasite' hypothesis revisited. *Mol Microbiol* **33**: 177-87.
- Iraburu, M.J.; Dominguez-Rosales, J.A.; Fontana, L.; Auster, A.; Garcia-Trevijano, E.R.; Covarrubias-Pinedo, A.; Rivas-Estilla, A.M.; Greenwel, P. & Rojkind, M. (2000): Tumor necrosis factor alpha down-regulates expression of the alpha1(I) collagen gene in rat hepatic stellate cells through a p20C/EBPbeta- and C/EBPdelta-dependent mechanism. *Hepatology* **31**: 1086-93.
- Ivashkiv, L.B. & Hu, X. (2004): Signaling by STATs. *Arthritis Res Ther* **6**: 159-68.
- Jahn, H.U.; Krüll, M.; Wuppermann, F.N.; Klucken, A.C.; Rosseau, S.; Seybold, J.; Hegemann, J.H.; Jantos, C.A. & Suttorp, N. (2000): Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* **182**: 1678-87.
- Jeffery, P.K. (2001): Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **164**: S28-38.
- Jeffery, P.K. (2004): Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **1**: 176-83.
- Johnson, P.R. & Burgess, J.K. (2004): Airway smooth muscle and fibroblasts in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* **4**: 102-8.
- Johnston, S.L. & Martin, R.J. (2005): *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*: a role in asthma pathogenesis? *Am J Respir Crit Care Med* **172**: 1078-89.
- Kalayoglu, M.V.; Libby, P. & Byrne, G.I. (2002): *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *Jama* **288**: 2724-31.
- Karvonen, M.; Tuomilehto, J.; Pitkaniemi, J.; Naukkarinen, A. & Saikku, P. (1994): Importance of smoking for *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *Int J Epidemiol* **23**: 1315-21.

- Katsuda, S.; Okada, Y.; Minamoto, T.; Oda, Y.; Matsui, Y. & Nakanishi, I. (1992): Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb* **12**: 494-502.
- Katsuda, S. & Kaji, T. (2003): Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb* **10**: 267-74.
- Kaukoranta-Tolvanen, S.S.; Ronni, T.; Leinonen, M.; Saikku, P. & Laitinen, K. (1996a): Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Pathog* **21**: 407-11.
- Kaukoranta-Tolvanen, S.S.; Teppo, A.M.; Laitinen, K.; Saikku, P.; Linnavuori, K. & Leinonen, M. (1996b): Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microb Pathog* **21**: 215-21.
- Kaviratne, M.; Hesse, M.; Leusink, M.; Cheever, A.W.; Davies, S.J.; McKerrow, J.H.; Wakefield, L.M.; Letterio, J.J. & Wynn, T.A. (2004): IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol* **173**: 4020-9.
- Kikuta, L.C.; Puolakkainen, M.; Kuo, C.C. & Campbell, L.A. (1991): Isolation and sequence analysis of the *Chlamydia pneumoniae* GroE operon. *Infect Immun* **59**: 4665-9.
- Kis, Z.; Tresó, B.; Burian, K.; Endresz, V.; Pallinger, E. *et al.* (2008): Expression of bacterial genes and induction of INF-gamma in human myeloid dendritic cells during persistent infection with *Chlamydophila pneumoniae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 324-34.
- Knight, D. (2001): Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation. *Immunol Cell Biol* **79**: 160-4.
- Kol, A.; Sukhova, G.K.; Lichtman, A.H. & Libby, P. (1998): Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* **98**: 300-7.
- Kol, A.; Bourcier, T.; Lichtman, A.H. & Libby, P. (1999): Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* **103**: 571-7.
- Kol, A.; Lichtman, A.H.; Finberg, R.W.; Libby, P. & Kurt-Jones, E.A. (2000): Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* **164**: 13-7.
- Konomi, H.; Hayashi, T.; Nakayasu, K. & Arima, M. (1984): Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. *Am J Pathol* **116**: 417-26.
- Krieg, R.; Eitner, A.; Gunther, W. & Halbhauer, K.J. (2007): Optimization of heterocyclic 4-hydroxystyryl derivatives for histological localization of endogenous and immunobound peroxidase activity. *Biotech Histochem* **82**: 235-62.
- Krüll, M.; Klucken, A.C.; Wuppermann, F.N.; Fuhrmann, O.; Magerl, C. *et al.* (1999): Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* **162**: 4834-41.
- Krüll, M.; Bockstaller, P.; Wuppermann, F.N.; Klucken, A.C.; Muhling, J. *et al.* (2006): Mechanisms of *Chlamydophila pneumoniae*-mediated GM-CSF release in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**: 375-82.
- Kucharz, E.J. (1992) *The collagens: Biochemistry and pathophysiology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kuo, C.C.; Jackson, L.A.; Campbell, L.A. & Grayston, J.T. (1995): *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* **8**: 451-61.

- Kuo, C.C. & Campbell, L.A. (2000): Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *J Infect Dis* **181 Suppl 3**: S432-6.
- Kurashima, K.; Kanauchi, T.; Takayanagi, N.; Sato, N.; Tokunaga, D.; Ubukata, M.; Yanagisawa, T.; Sugita, Y. & Kanazawa, M. (2005): Serum IgG and IgA antibodies to *Chlamydia pneumoniae* and severity of emphysema. *Respirology* **10**: 572-8.
- La Verda, D. & Byrne, G.I. (1994): Interactions between macrophages and chlamydiae. *Immunol Ser* **60**: 381-99.
- Labat-Robert, J.; Szendroi, M.; Godeau, G. & Robert, L. (1985): Comparative distribution patterns of type I and III collagens and fibronectin in human arteriosclerotic aorta. *Pathol Biol (Paris)* **33**: 261-5.
- Lad, S.P.; Fukuda, E.Y.; Li, J.; de la Maza, L.M. & Li, E. (2005): Up-regulation of the JAK/STAT1 signal pathway during *Chlamydia trachomatis* infection. *J Immunol* **174**: 7186-93.
- Leinonen, M. (1993): Pathogenetic mechanisms and epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Heart J* **14 Suppl K**: 57-61.
- Lekstrom-Himes, J. & Xanthopoulos, K.G. (1998): Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* **273**: 28545-8.
- Li, X.L.; Boyanapalli, M.; Weihua, X.; Kalvakolanu, D.V. & Hassel, B.A. (1998): Induction of interferon synthesis and activation of interferon-stimulated genes by liposomal transfection reagents. *J Interferon Cytokine Res* **18**: 947-52.
- Libby, P.; Geng, Y.J.; Aikawa, M.; Schoenbeck, U.; Mach, F.; Clinton, S.K.; Sukhova, G.K. & Lee, R.T. (1996): Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* **7**: 330-5.
- Lieberman, D.; Ben-Yaakov, M.; Lazarovich, Z.; Ohana, B. & Boldur, I. (2001): *Chlamydia pneumoniae* infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: analysis of 250 hospitalizations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**: 698-704.
- Lindholt, J.S.; Ostergard, L.; Henneberg, E.W.; Fasting, H. & Andersen, P. (1998): Failure to demonstrate *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic abdominal aortic aneurysms by a nested polymerase chain reaction (PCR). *Eur J Vasc Endovasc Surg* **15**: 161-4.
- Maass, M.; Gieffers, J. & Solbach, W. (2000): Atherogenetically relevant cells support continuous growth of *Chlamydia pneumoniae*. *Herz* **25**: 68-72.
- Maeda, S.; Dean, D.D.; Gay, I.; Schwartz, Z. & Boyan, B.D. (2001): Activation of latent transforming growth factor beta1 by stromelysin 1 in extracts of growth plate chondrocyte-derived matrix vesicles. *J Bone Miner Res* **16**: 1281-90.
- Magnusson, M.K. & Mosher, D.F. (1998): Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**: 1363-70.
- Mallat, Z. & Tedgui, A. (2002): The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol* **13**: 523-9.
- Mamata, Y.; Hakki, A.; Yamamoto, Y.; Newton, C.; Klein, T.W.; Pross, S. & Friedman, H. (2005): Nicotine modulates cytokine production by *Chlamydia pneumoniae* infected human peripheral blood cells. *Int Immunopharmacol* **5**: 749-56.
- Marcenaro, E.; Della Chiesa, M.; Bellora, F.; Parolini, S.; Millo, R.; Moretta, L. & Moretta, A. (2005): IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* **174**: 3992-8.

- Mauviel, A.; Heino, J.; Kahari, V.M.; Hartmann, D.J.; Loyau, G.; Pujol, J.P. & Vuorio, E.** (1991): Comparative effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  on collagen production and corresponding procollagen mRNA levels in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **96**: 243-9.
- Mazzarella, G.; Bianco, A.; Catena, E.; De Palma, R. & Abbate, G.F.** (2000): Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy* **55 Suppl 61**: 6-9.
- McCaffrey, T.A.; Fu, C.; Du, B.; Eksinar, S.; Kent, K.C. et al.** (2000): High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest* **105**: 653-62.
- McClarty, G.** (1994): Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism. *Trends Microbiol* **2**: 157-64.
- McCullagh, K.G.; Duance, V.C. & Bishop, K.A.** (1980): The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J Pathol* **130**: 45-55.
- Meiss, R.A.** (1999): Influence of intercellular tissue connections on airway muscle mechanics. *J Appl Physiol* **86**: 5-15.
- Melgosa, M.P.; Kuo, C.C. & Campbell, L.A.** (1993): Outer membrane complex proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **112**: 199-204.
- Michel, J.B.** (2003): Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: 2146-54.
- Mifflin, R.C.; Saada, J.I.; Di Mari, J.F.; Adegboyega, P.A.; Valentich, J.D. & Powell, D.W.** (2002): Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**: C824-34.
- Milanese, M.; Crimi, E.; Scordamaglia, A.; Riccio, A.; Pellegrino, R.; Canonica, G.W. & Brusasco, V.** (2001): On the functional consequences of bronchial basement membrane thickening. *J Appl Physiol* **91**: 1035-40.
- Minshall, E.; Chakir, J.; Laviolette, M.; Molet, S.; Zhu, Z.; Olivenstein, R.; Elias, J.A. & Hamid, Q.** (2000): IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* **105**: 232-8.
- Minshall, E.M.; Leung, D.Y.; Martin, R.J.; Song, Y.L.; Cameron, L.; Ernst, P. & Hamid, Q.** (1997): Eosinophil-associated TGF- $\beta$ 1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**: 326-33.
- Moazed, T.C.; Kuo, C.C.; Grayston, J.T. & Campbell, L.A.** (1998): Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. *J Infect Dis* **177**: 1322-5.
- Moelleken, K. & Hegemann, J.H.** (2008): The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Mol Microbiol* **67**: 403-19.
- Molestina, R.E.; Miller, R.D.; Ramirez, J.A. & Summersgill, J.T.** (1999): Infection of human endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae* stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes. *Infect Immun* **67**: 1323-30.
- Moreno, P.R.; Falk, E.; Palacios, I.F.; Newell, J.B.; Fuster, V. & Fallon, J.T.** (1994): Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* **90**: 775-8.
- Moroguchi, A.; Ishimura, K.; Okano, K.; Wakabayashi, H.; Maeba, T. & Maeta, H.** (2004): Interleukin-10 suppresses proliferation and remodeling of extracellular matrix of cultured human skin fibroblasts. *Eur Surg Res* **36**: 39-44.
- Moulder, J.W.** (1991): Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* **55**: 143-90.

- Muhlestein, J.B. (2000): *Chlamydia pneumoniae*-induced atherosclerosis in a rabbit model. *J Infect Dis* **181** Suppl 3: S505-7.
- Murata, K.; Motayama, T. & Kotake, C. (1986): Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* **60**: 251-62.
- Mussa, F.F.; Chai, H.; Wang, X.; Yao, Q.; Lumsden, A.B. & Chen, C. (2006): *Chlamydia pneumoniae* and vascular disease: an update. *J Vasc Surg* **43**: 1301-7.
- Nagineni, C.N.; Pardhasaradhi, K.; Martins, M.C.; Detrick, B. & Hooks, J.J. (1996): Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun* **64**: 4188-96.
- Nakatani, T.; Marui, T.; Yamamoto, T.; Kurosaka, M.; Akisue, T. & Matsumoto, K. (2001): Establishment and characterization of cell line TNMY1 derived from human malignant fibrous histiocytoma. *Pathol Int* **51**: 595-602.
- Netea, M.G.; Kullberg, B.J.; Galama, J.M.; Stalenhoef, A.F.; Dinarello, C.A. & Van der Meer, J.W. (2002): Non-LPS components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production through Toll-like receptor 2-dependent pathways. *Eur J Immunol* **32**: 1188-95.
- Newby, A.C. & Zaltsman, A.B. (2000): Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* **190**: 300-9.
- Nusgens, B.V.; Humbert, P.; Rougier, A.; Colige, A.C.; Haftek, M.; Lambert, C.A.; Richard, A.; Creidi, P. & Lapiere, C.M. (2001): Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *J Invest Dermatol* **116**: 853-9.
- Ohbayashi, H. & Shimokata, K. (2005): Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**: 177-81.
- Pantoja, L.G.; Miller, R.D.; Ramirez, J.A.; Molestina, R.E. & Summersgill, J.T. (2000): Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Infect Immun* **68**: 6478-81.
- Papadopoulos, N.G.; Stanciu, L.A.; Papi, A.; Holgate, S.T. & Johnston, S.L. (2002): A defective type 1 response to rhinovirus in atopic asthma. *Thorax* **57**: 328-32.
- Pasterkamp, G.; Schoneveld, A.H.; Hijnen, D.J.; de Kleijn, D.P.; Teepen, H.; van der Wal, A.C. & Borst, C. (2000): Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis* **150**: 245-53.
- Pasternack, R.; Huhtala, H. & Karjalainen, J. (2005): *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* serology and asthma in adults: a longitudinal analysis. *J Allergy Clin Immunol* **116**: 1123-8.
- Payne, D.N.; Rogers, A.V.; Adelroth, E.; Bandi, V.; Guntupalli, K.K.; Bush, A. & Jeffery, P.K. (2003): Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 78-82.
- Pearce, J.H. & Gaston, J.S. (2001): *Chlamydia*. In: *Molecular medical microbiology*. (ed M. Sussman), Vol. 3, Academic Press, San Diego, pp. 1825-1864.
- Penttila, J.M.; Anttila, M.; Puolakkainen, M.; Laurila, A.; Varkila, K.; Sarvas, M.; Makela, P.H. & Rautonen, N. (1998): Local immune responses to *Chlamydia pneumoniae* in the lungs of BALB/c mice during primary infection and reinfection. *Infect Immun* **66**: 5113-8.
- Persson, K. (1990): Epidemiological and clinical aspects on infections due to *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). *Scand J Infect Dis Suppl* **69**: 63-7.

- Peters, J.; Hess, S.; Endlich, K.; Thalmann, J.; Holzberg, D.; Kracht, M.; Schaefer, M.; Bartling, G. & Klos, A. (2005): Silencing or permanent activation: host-cell responses in models of persistent *Chlamydia pneumoniae* infection. *Cell Microbiol* **7**: 1099-108.
- Pickering, J.G.; Ford, C.M.; Tang, B. & Chow, L.H. (1997): Coordinated effects of fibroblast growth factor-2 on expression of fibrillar collagens, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human vascular smooth muscle cells. Evidence for repressed collagen production and activated degradative capacity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 475-82.
- Pizzichini, M.M.; Pizzichini, E.; Efthimiadis, A.; Clelland, L.; Mahony, J.B.; Dolovich, J. & Hargreave, F.E. (1997): Markers of inflammation in induced sputum in acute bronchitis caused by *Chlamydia pneumoniae*. *Thorax* **52**: 929-31; discussion 926-7.
- Plataki, M.; Tzortzaki, E.; Ryttilä, P.; Demosthenes, M.; Koutsopoulos, A. & Siafakas, N.M. (2006): Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **1**: 161-71.
- Pospischil, A.; Thoma, R.; Hilbe, M.; Grest, P. & Gebbers, J.O. (2002): Abortion in woman caused by caprine *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Med Wkly* **132**: 64-6.
- Postlethwaite, A.E.; Raghow, R.; Stricklin, G.P.; Poppleton, H.; Seyer, J.M. & Kang, A.H. (1988): Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol* **106**: 311-8.
- Postlethwaite, A.E.; Holness, M.A.; Katai, H. & Raghow, R. (1992): Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest* **90**: 1479-85.
- Postma, D.S. & Timens, W. (2006): Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **3**: 434-9.
- Prebeck, S.; Kirschning, C.; Durr, S.; da Costa, C.; Donath, B.; Brand, K.; Redecke, V.; Wagner, H. & Miethke, T. (2001): Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells. *J Immunol* **167**: 3316-23.
- Prochnau, D.; Rödel, J.; Hartmann, M.; Straube, E. & Figulla, H.R. (2004): Growth factor production in human endothelial cells after *Chlamydia pneumoniae* infection. *Int J Med Microbiol* **294**: 53-7.
- Ramji, D.P. & Foka, P. (2002): CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* **365**: 561-75.
- Rasmussen, S.J.; Eckmann, L.; Quayle, A.J.; Shen, L.; Zhang, Y.X.; Anderson, D.J.; Fierer, J.; Stephens, R.S. & Kagnoff, M.F. (1997): Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest* **99**: 77-87.
- Redecke, V.; Dalhoff, K.; Bohnet, S.; Braun, J. & Maass, M. (1998): Interaction of *Chlamydia pneumoniae* and human alveolar macrophages: infection and inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**: 721-7.
- Reinhardt, B.; Winkler, M.; Schaarschmidt, P.; Pretsch, R.; Zhou, S. *et al.* (2006): Human cytomegalovirus-induced reduction of extracellular matrix proteins in vascular smooth muscle cell cultures: a pathomechanism in vasculopathies? *J Gen Virol* **87**: 2849-58.
- Reinhold, P.; Kirschvink, N.; Theegarten, D. & Berndt, A. (2008): An experimentally induced *Chlamydia suis* infection in pigs results in severe lung function disorders and pulmonary inflammation. *Vet Res* **39**: 35.
- Rennard, S.I. (1998): COPD: overview of definitions, epidemiology, and factors influencing its development. *Chest* **113**: 235S-241S.

- Reunanen, N.; Foschi, M.; Han, J. & Kahari, V.M.** (2000): Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 inhibits type I collagen expression by human skin fibroblasts. *J Biol Chem* **275**: 34634-9.
- Richter, A.; Puddicombe, S.M.; Lordan, J.L.; Bucchieri, F.; Wilson, S.J.; Djukanovic, R.; Dent, G.; Holgate, S.T. & Davies, D.E.** (2001): The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**: 385-91.
- Rinaldi, N.; Willhauck, M.; Weis, D.; Brado, B.; Kern, P.; Lukoschek, M.; Schwarz-Eywill, M. & Barth, T.F.** (2001): Loss of collagen type IV in rheumatoid synovia and cytokine effect on the collagen type-IV gene expression in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis. *Virchows Arch* **439**: 675-82.
- Riquet, F.B.; Lai, W.F.; Birkhead, J.R.; Suen, L.F.; Karsenty, G. & Goldring, M.B.** (2000): Suppression of type I collagen gene expression by prostaglandins in fibroblasts is mediated at the transcriptional level. *Mol Med* **6**: 705-19.
- Robinson, S.R.; Dobson, C. & Lyons, J.** (2004): Challenges and directions for the pathogen hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**: 629-37.
- Roche, W.R.; Beasley, R.; Williams, J.H. & Holgate, S.T.** (1989): Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* **1**: 520-4.
- Rocnik, E.F.; Chan, B.M. & Pickering, J.G.** (1998): Evidence for a role of collagen synthesis in arterial smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* **101**: 1889-98.
- Rödel, J.; Groh, A.; Vogelsang, H.; Lehmann, M.; Hartmann, M. & Straube, E.** (1998a): Beta interferon is produced by *Chlamydia trachomatis*-infected fibroblast-like synoviocytes and inhibits gamma interferon-induced HLA-DR expression. *Infect Immun* **66**: 4491-5.
- Rödel, J.; Straube, E.; Lungershausen, W.; Hartmann, M. & Groh, A.** (1998b): Secretion of cytokines by human synoviocytes during in vitro infection with *Chlamydia trachomatis*. *J Rheumatol* **25**: 2161-8.
- Rödel, J.; Groh, A.; Hartmann, M.; Schmidt, K.H.; Lehmann, M.; Lungershausen, W. & Straube, E.** (1999): Expression of interferon regulatory factors and indoleamine 2,3-dioxygenase in *Chlamydia trachomatis*-infected synovial fibroblasts. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **187**: 205-12.
- Rödel, J.; Woytas, M.; Groh, A.; Schmidt, K.H.; Hartmann, M.; Lehmann, M. & Straube, E.** (2000): Production of basic fibroblast growth factor and interleukin 6 by human smooth muscle cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* **68**: 3635-41.
- Rödel, J.; Assefa, S.; Prochnau, D.; Woytas, M.; Hartmann, M.; Groh, A. & Straube, E.** (2001): Interferon-beta induction by *Chlamydia pneumoniae* in human smooth muscle cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **32**: 9-15.
- Rödel, J.; Prochnau, D.; Prager, K.; Pentcheva, E.; Hartmann, M. & Straube, E.** (2003): Increased production of matrix metalloproteinases 1 and 3 by smooth muscle cells upon infection with *Chlamydia pneumoniae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**: 159-64.
- Rödel, J.; Prochnau, D.; Prager, K.; Baumert, J.; Schmidt, K.H. & Straube, E.** (2004): *Chlamydia pneumoniae* decreases smooth muscle cell proliferation through induction of prostaglandin E2 synthesis. *Infect Immun* **72**: 4900-4.
- Rödel, J.; Lehmann, M.; Vogelsang, H. & Straube, E.** (2007): *Chlamydia pneumoniae* infection of aortic smooth muscle cells reduces platelet-derived growth factor receptor-beta expression. *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**: 363-71.
- Rohde, L.E. & Lee, R.T.** (2003): Pathophysiology of atherosclerotic plaque development and rupture: an overview. *Semin Vasc Med* **3**: 347-54.
- Rolfs, A.; Schuller, I.; Finckh, U. & Weber-Rolfs, I.** (1992): *PCR: Clinical Diagnostics and Research*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 102-107.



- Romagnani, S.** (2001): TH1/TH2 Interleukins. In: *Cytokine Reference*. (eds J.J. Oppenheim & M. Feldmann), Vol. 1, Academic Press, San Diego, pp. 99-107.
- Ross, R.** (1999): Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**: 115-26.
- Rothfuchs, A.G.; Trumstedt, C.; Mattei, F.; Schiavoni, G.; Hidmark, A.; Wigzell, H. & Rottenberg, M.E.** (2006): STAT1 regulates IFN-alpha beta- and IFN-gamma-dependent control of infection with *Chlamydia pneumoniae* by nonhemopoietic cells. *J Immunol* **176**: 6982-90.
- Rottenberg, M.E.; Gigliotti-Rothfuchs, A. & Wigzell, H.** (2002): The role of IFN-gamma in the outcome of chlamydial infection. *Curr Opin Immunol* **14**: 444-51.
- Roy, S.K.; Hu, J.; Meng, Q.; Xia, Y.; Shapiro, P.S. et al.** (2002): MEKK1 plays a critical role in activating the transcription factor C/EBP-beta-dependent gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7945-50.
- Rupp, J.; Hellwig-Burgel, T.; Wobbe, V.; Seitzer, U.; Brandt, E. & Maass, M.** (2005): *Chlamydia pneumoniae* infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3447-52.
- Russell, W.C.; Newman, C. & Williamson, D.H.** (1975): A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* **253**: 461-2.
- Sachse, K. & Grossmann, E.** (2002): Chlamydienerkrankungen der Nutz- und Haustiere - Zoonotisches Potential der Erreger und diagnostische Fragen. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **109**: 142-8.
- Saikku, P.; Leinonen, M.; Mattila, K.; Ekman, M.R.; Nieminen, M.S.; Makela, P.H.; Huttunen, J.K. & Valtonen, V.** (1988): Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* **2**: 983-6.
- Saikku, P.** (1999): Epidemiology of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Am Heart J* **138**: S500-3.
- Sasu, S.; LaVerda, D.; Qureshi, N.; Golenbock, D.T. & Beasley, D.** (2001): *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res* **89**: 244-50.
- Schachter, J.; Stephens, R.S.; Timms, P.; Kuo, C.; Bavoil, P.M. et al.** (2001): Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 249; author reply 251-3.
- Schmidt, R.; Redecke, V.; Breithfeld, Y.; Wantia, N.; Miethke, T. et al.** (2006): EMMPRIN (CD 147) is a central activator of extracellular matrix degradation by *Chlamydia pneumoniae*-infected monocytes. Implications for plaque rupture. *Thromb Haemost* **95**: 151-8.
- Scidmore, M.A.; Fischer, E.R. & Hackstadt, T.** (2003): Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect Immun* **71**: 973-84.
- Scott, J.E.** (1995): Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J Anat* **187 ( Pt 2)**: 259-69.
- Selzman, C.H.; Netea, M.G.; Zimmerman, M.A.; Weinberg, A.; Reznikov, L.L.; Grover, F.L. & Dinarello, C.A.** (2003): Atherogenic effects of *Chlamydia pneumoniae*: refuting the innocent bystander hypothesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* **126**: 688-93.
- Shah, P.K.** (2003): Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol* **41**: 15S-22S.
- Shapiro, S.D. & Senior, R.M.** (1999): Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**: 1100-2.
- Shekhonin, B.V.; Domogatsky, S.P.; Muzykantov, V.R.; Idelson, G.L. & Rukosuev, V.S.** (1985): Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Coll Relat Res* **5**: 355-68.

- Shor, A.; Kuo, C.C. & Patton, D.L.** (1992): Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S Afr Med J* **82**: 158-61.
- Shor, A. & Phillips, J.I.** (2000): Histological and ultrastructural findings suggesting an initiating role for *Chlamydia pneumoniae* in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cardiovasc J S Afr* **11**: 16-23.
- Siwik, D.A.; Chang, D.L. & Colucci, W.S.** (2000): Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* **86**: 1259-65.
- Solis-Herruzo, J.A.; Brenner, D.A. & Chojkier, M.** (1988): Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* **263**: 5841-5.
- Song, E.; Ouyang, N.; Horbelt, M.; Antus, B.; Wang, M. & Exton, M.S.** (2000a): Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* **204**: 19-28.
- Song, Y.G.; Kwon, H.M.; Kim, J.M.; Hong, B.K.; Kim, D.S. et al.** (2000b): Serologic and histopathologic study of *Chlamydia pneumoniae* infection in atherosclerosis: a possible pathogenetic mechanism of atherosclerosis induced by *Chlamydia pneumoniae*. *Yonsei Med J* **41**: 319-27.
- Sopori, M.L. & Kozak, W.** (1998): Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol* **83**: 148-56.
- Stefanovic, B.; Schnabl, B. & Brenner, D.A.** (2002): Inhibition of collagen alpha 1(I) expression by the 5' stem-loop as a molecular decoy. *J Biol Chem* **277**: 18229-37.
- Stephens, R.S.; Koshiyama, K.; Lewis, E. & Kubo, A.** (2001): Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae. *Mol Microbiol* **40**: 691-9.
- Stephens, R.S.** (2003): The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol* **11**: 44-51.
- Strachan, D.P.; Carrington, D.; Mendall, M.; Butland, B.K.; Yarnell, J.W. & Elwood, P.** (2000): *Chlamydia pneumoniae* serology, lung function decline, and treatment for respiratory disease. *Am J Respir Crit Care Med* **161**: 493-7.
- Stratton, C.W. & Wheldon, D.B.** (2006): Multiple sclerosis: an infectious syndrome involving *Chlamydo-phila pneumoniae*. *Trends Microbiol* **14**: 474-9.
- Su, H.; Raymond, L.; Rockey, D.D.; Fischer, E.; Hackstadt, T. & Caldwell, H.D.** (1996): A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11143-8.
- Subbarayan, V.; Sabichi, A.L.; Llansa, N.; Lippman, S.M. & Menter, D.G.** (2001): Differential expression of cyclooxygenase-2 and its regulation by tumor necrosis factor-alpha in normal and malignant prostate cells. *Cancer Res* **61**: 2720-6.
- Tanabe, J.; Izawa, A.; Takemi, N.; Miyauchi, Y.; Torii, Y.; Tsuchiyama, H.; Suzuki, T.; Sone, S. & Ando, K.** (2007): Interferon-beta reduces the mouse liver fibrosis induced by repeated administration of concanavalin A via the direct and indirect effects. *Immunology* **122**: 562-70.
- Taylor-Robinson, D. & Thomas, B.J.** (2000): *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic tissue. *J Infect Dis* **181 Suppl 3**: S437-40.
- ten Brinke, A.; van Dissel, J.T.; Sterk, P.J.; Zwinderman, A.H.; Rabe, K.F. & Bel, E.H.** (2001): Persistent airflow limitation in adult-onset nonatopic asthma is associated with serologic evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Allergy Clin Immunol* **107**: 449-54.

**Theegarten, D.; Mogilevski, G.; Anhenn, O.; Stamatis, G.; Jaeschock, R. & Morgenroth, K.** (2000): The role of *Chlamydia* in the pathogenesis of pulmonary emphysema. Electron microscopy and immunofluorescence reveal corresponding findings as in atherosclerosis. *Virchows Arch* **437**: 190-3.

**Thomas, M.; Wong, Y.; Thomas, D.; Ajaz, M.; Tsang, V.; Gallagher, P.J. & Ward, M.E.** (1999): Relation between direct detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in human coronary arteries at postmortem examination and histological severity (Stary grading) of associated atherosclerotic plaque. *Circulation* **99**: 2733-6.

**Thomas, S.M.; Garrity, L.F.; Brandt, C.R.; Schobert, C.S.; Feng, G.S.; Taylor, M.W.; Carlin, J.M. & Byrne, G.I.** (1993): IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia* spp. or *Toxoplasma* growth. *J Immunol* **150**: 5529-34.

**Thylefors, B.; Negrel, A.D.; Pararajasegaram, R. & Dadzie, K.Y.** (1995): Global data on blindness. *Bull World Health Organ* **73**: 115-21.

**Tseng, C.T. & Rank, R.G.** (1998): Role of NK cells in early host response to chlamydial genital infection. *Infect Immun* **66**: 5867-75.

**Unemori, E.N.; Amento, E.P.; Bauer, E.A. & Horuk, R.** (1993): Melanoma growth-stimulatory activity/GRO decreases collagen expression by human fibroblasts. Regulation by C-X-C but not C-C cytokines. *J Biol Chem* **268**: 1338-42.

**van der Rest, M. & Garrone, R.** (1991): Collagen family of proteins. *Faseb J* **5**: 2814-23.

**van der Wal, A.C.; Becker, A.E.; van der Loos, C.M. & Das, P.K.** (1994): Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* **89**: 36-44.

**van Zandbergen, G.; Gieffers, J.; Kothe, H.; Rupp, J.; Bollinger, A. et al.** (2004): *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol* **172**: 1768-76.

**Varga, J.; Diaz-Perez, A.; Rosenbloom, J. & Jimenez, S.A.** (1987): PGE<sub>2</sub> causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **147**: 1282-8.

**Varga, J.; Olsen, A.; Herhal, J.; Constantine, G.; Rosenbloom, J. & Jimenez, S.A.** (1990): Interferon-gamma reverses the stimulation of collagen but not fibronectin gene expression by transforming growth factor-beta in normal human fibroblasts. *Eur J Clin Invest* **20**: 487-93.

**Vassallo, R.; Tamada, K.; Lau, J.S.; Kroening, P.R. & Chen, L.** (2005): Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. *J Immunol* **175**: 2684-91.

**Vehmaan-Kreula, P.; Puolakkainen, M.; Sarvas, M.; Welgus, H.G. & Kovanen, P.T.** (2001): *Chlamydia pneumoniae* proteins induce secretion of the 92-kDa gelatinase by human monocyte- derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: E1-8.

**Verrecchia, F. & Mauviel, A.** (2007): Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* **13**: 3056-62.

**Vichai, V.; Suyarnsesthakorn, C.; Pittayakhajonwut, D.; Sriklung, K. & Kirtikara, K.** (2005): Positive feedback regulation of COX-2 expression by prostaglandin metabolites. *Inflamm Res* **54**: 163-72.

**Vignola, A.M.; Chanez, P.; Chiappara, G.; Merendino, A.; Zinnanti, E.; Bousquet, J.; Bellia, V. & Bonsignore, G.** (1996): Release of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases. *Clin Exp Immunol* **106**: 114-9.

- Vignola, A.M.; Chanez, P.; Chiappara, G.; Merendino, A.; Pace, E. et al.** (1997): Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* **156**: 591-9.
- Vignola, A.M.; La Grutta, S.; Chiappara, G.; Benkeder, A.; Bellia, V. & Bonsignore, G.** (2002): Cellular network in airways inflammation and remodelling. *Paediatr Respir Rev* **3**: 41-6.
- Virok, D.; Kis, Z.; Kari, L.; Barzo, P.; Sipka, R. et al.** (2006): *Chlamydophila pneumoniae* and human cytomegalovirus in atherosclerotic carotid plaques--combined presence and possible interactions. *Acta Microbiol Immunol Hung* **53**: 35-50.
- von Hertzen, L.; Alakarppa, H.; Koskinen, R.; Liippo, K.; Surcel, H.M.; Leinonen, M. & Saikku, P.** (1997): *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiol Infect* **118**: 155-64.
- von Hertzen, L.** (2002): Role of persistent infection in the control and severity of asthma: focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Respir J* **19**: 546-56.
- von Lampe, B.; Barthel, B.; Coupland, S.E.; Riecken, E.O. & Rosewicz, S.** (2000): Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **47**: 63-73.
- Weihua, X.; Kolla, V. & Kalvakolanu, D.V.** (1997): Interferon gamma-induced transcription of the murine ISGF3gamma (p48) gene is mediated by novel factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 103-8.
- Weihua, X.; Lihua, W.; Xiaoyi, Y.; Taosheng, C.; Hodge, D.; Johnson, P.F. & Farrar, W.** (2001): CCAAT/enhancer-binding protein beta mediates interferon-gamma-induced p48 (ISGF3-gamma) gene transcription in human monocytic cells. *J Biol Chem* **276**: 23275-81.
- Wellinghausen, N.; Straube, E.; Freidank, H.; von Baum, H.; Marre, R. & Essig, A.** (2006): Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. *Int J Med Microbiol* **296**: 485-91.
- Werling, D. & Jungi, T.W.** (2003): TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* **91**: 1-12.
- Williams, D.M.; Grubbs, B.G.; Park-Snyder, S.; Rank, R.G. & Bonewald, L.F.** (1996): Activation of latent transforming growth factor beta during *Chlamydia trachomatis*-induced murine pneumonia. *Res Microbiol* **147**: 251-62.
- Wolf, K. & Hackstadt, T.** (2001): Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Cell Microbiol* **3**: 145-52.
- Wong, W.R.; Kossodo, S. & Kochevar, I.E.** (2001): Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc* **100**: 377-82.
- Wu, L.; Skinner, S.J.; Lambie, N.; Vuletic, J.C.; Blasi, F. & Black, P.N.** (2000): Immunohistochemical staining for *Chlamydia pneumoniae* is increased in lung tissue from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **162**: 1148-51.
- Wuppermann, F.N.; Hegemann, J.H. & Jantos, C.A.** (2001): Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* **184**: 181-7.
- Wynn, T.A.** (2007): Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* **117**: 524-9.
- Xue, M.L.; Zhu, H.; Thakur, A. & Willcox, M.** (2002): 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Cell Biol* **80**: 340-5.

- Yamamoto, T.; Eckes, B. & Krieg, T.** (2001): Effect of interleukin-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential regulation by transforming growth factor-beta and monocyte chemoattractant protein-1. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 200-5.
- Yamashita, K.; Ouchi, K.; Shirai, M.; Gondo, T.; Nakazawa, T. & Ito, H.** (1998): Distribution of *Chlamydia pneumoniae* infection in the atherosclerotic carotid artery. *Stroke* **29**: 773-8.
- Yasui, H.; Andoh, A.; Bamba, S.; Inatomi, O.; Ishida, H. & Fujiyama, Y.** (2004): Role of fibroblast growth factor-2 in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human intestinal myofibroblasts. *Digestion* **69**: 34-44.
- Yokoyama, A.; Kohno, N.; Fujino, S.; Hamada, H.; Inoue, Y.; Fujioka, S.; Ishida, S. & Hiwada, K.** (1995): Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **151**: 1354-8.
- Yoneda, H.; Miura, K.; Matsushima, H.; Sugi, K.; Murakami, T. et al.** (2003): Aspirin inhibits *Chlamydia pneumoniae*-induced NF-kappa B activation, cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis and attenuates chlamydial growth. *J Med Microbiol* **52**: 409-15.
- Yu, Q. & Stamenkovic, I.** (2000): Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* **14**: 163-76.
- Yurchenco, P.D. & Schittny, J.C.** (1990): Molecular architecture of basement membranes. *Faseb J* **4**: 1577-90.
- Zhang, J.P. & Stephens, R.S.** (1992): Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell* **69**: 861-9.
- Zhang, S.; Smartt, H.; Holgate, S.T. & Roche, W.R.** (1999): Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma. *Lab Invest* **79**: 395-405.
- Zhong, G.; Fan, T. & Liu, L.** (1999): *Chlamydia* inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J Exp Med* **189**: 1931-8.

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Eberhard Straube danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit durchführen zu können. Darüber hinaus danke ich ihm für die hilfreichen Empfehlungen zur Überarbeitung des Manuskriptes.

Bei Herrn PD Dr. Jürgen Rödel bedanke ich mich für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, die umfassende Betreuung, die wertvollen Diskussionen und Anregungen zur Konzeption der Experimente, sowie für die kritische Durchsicht der vorliegenden Schrift.

Von Herrn PD Dr. Karl-Hermann Schmidt wurden mir die Glyzerinkulturen zur Isolierung des rekombinanten chlamydialen Hsp60 zur Verfügung gestellt. Für die Synthese und Aufreinigung dieses Proteins sowie für weitere Fragestellungen erhielt ich von ihm wesentliche Hinweise. Weiterhin danke ich ihm für die Sequenzierung von PCR-Produkten. Frau Daniela Hoffmann danke ich für die technische Anleitung.

Für die Erstellung der Laserscanningmikroskop-Aufnahmen danke ich Frau Dr. Annett Eitner vom Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums Jena. Bei Frau Isolde Bernhardt bedanke ich mich für die Fertigstellung der Immunfluoreszenz-Präparate.

Frau Dipl.-Biol. Svea Sachse, Frau Dipl.-Biol. Katja Schwarzer sowie Frau Dr. Anke Hildebrandt danke ich für hilfreiche Hinweise und Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Frau Katrin Prager für die ausgezeichnete technische Assistenz. Sie vermittelte mir die Grundlagen der Zellkultivierung und arbeitete mich in verschiedene molekularbiologische Arbeitstechniken ein. Darüber hinaus stand sie mir während des ganzen Projektes bei den experimentellen Untersuchungen hilfreich zur Seite.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung, die sie mir jederzeit zukommen ließen.

## 9. Anlagen

### Lebenslauf

Jürgen Baumert

geboren am 17.09.1971 in Jena

<i>1978 – 1988</i>	Polytechnische Oberschule
<i>1988 – 1990</i>	Erweiterte Oberschule, Abschluss: Abitur
<i>1991 – 1992</i>	Wehrersatzdienst
<i>1992 – 1999</i>	Biologiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena Hauptfach: Ökologie, Schwerpunkt Limnologie Nebenfächer: Humanbiologie/Anthropologie, Zoologie, Botanik Abschluss: <b>Diplom-Biologe</b>
<i>2000 – 2002</i>	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, BLEI-Institut GmbH Jena
<i>2002 – 2007</i>	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena
<i>seit 11/2002</i>	Doktorand am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena

## Wissenschaftliche Beiträge und Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

**Baumert, J.;** Schmidt, K. H.; Eitner, A.; Straube, E. & Rödel, J. (Manuskript eingereicht): Host cell cytokines induced by *Chlamydia pneumoniae* decrease the expression of interstitial collagens and fibronectin in fibroblasts.

Rödel, J.; Prochnau, D.; Prager, K.; **Baumert, J.;** Schmidt, K.H. & Straube, E. (2004): *Chlamydia pneumoniae* decreases smooth muscle cell proliferation through induction of prosta-glandin E<sub>2</sub> synthesis. *Infect Immun* **72**: 4900-4.

### Vorträge/Poster

**Baumert, J.;** Rödel, J.; Prager, K. & Straube, E. (2005): Produktion extrazellulärer Matrixproteine in *Chlamydia pneumoniae*-infizierten humanen glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Vortrag, 3. Deutscher Chlamydienworkshop Jena.

**Baumert, J.;** Rödel, J.; Prager, K. & Straube, E. (2004): Production of extracellular matrixproteins by human smooth muscle cells and fibroblasts infected with *Chlamydia pneumoniae*. Posterbeitrag, In J. Deák (ed): Proceedings Fifth Meeting of the European Society for Chlamydia Research. Pauker, Budapest, p. 177.

**Baumert, J.;** Rödel, J.; Prager, K. & Straube, E. (2006): The influence of cytokines on synthesis of interstitial collagens by *Chlamydia pneumoniae*-infected fibroblasts. Posterbeitrag, 4. Deutscher Chlamydienworkshop Düsseldorf.

Rödel, J.; **Baumert, J.;** Prager, K.; Prochnau, D. & Straube, E. (2005): Vergleich der Effekte von *Chlamydia pneumoniae* und Zytomegalievirus auf vaskuläre glatte Muskelzellen. Vortrag, 3. Deutscher Chlamydienworkshop Jena.

Rödel, J.; Prochnau, D.; Prager, K.; **Baumert, J.;** Schmidt, K.H. & Straube, E. (2004): *Chlamydia pneumoniae* infection of smooth muscle cells stimulates the release of matrix metalloproteinases and factors inhibiting smooth muscle cell proliferation. Vortrag, In J. Deák (ed): Proceedings Fifth Meeting of the European Society for Chlamydia Research. Pauker, Budapest, p. 115.



### **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, 04. Juli 2008

Jürgen Baumert